

ヘパリン・プロスタグランジン I₂ 内包ヒドロゲルを担持した 抗血栓性ポリエーテルウレタンウレア

福留功博

Antithrombogenic Polyetherurethaneurea with Heparin and/or Prostaglandin I₂ Immobilized in Hydrogels

Norihiro FUKUDOME

(Received September 26, 2007)

Abstract Polyetherurethaneurea (PEUU) with heparin and/or prostaglandin I₂ (PGI₂) immobilized on crosslinked polyacrylamide hydrogels were prepared by the addition of dry hydrogels to a PEUU dimethylformamide solution. Tensile strength of the PEUU film was not weakened very much by the addition of the hydrogels. Immobilized heparin was found to be continuously released from the PEUU matrix at 37°C in a physiological saline. Antithrombogenic activity of PEUU with heparin and/or PGI₂ was evaluated by activated partial thromboplastin time (aPTT), whole blood clotting time, and inhibition of platelet aggregation. The heparin-immobilized PEUU exhibited excellent anticoagulant activity and the PGI₂-immobilized PEUU completely inhibit platelet aggregation of human blood after sitting for at least 72 h in a physiological saline.

Keywords [Polyetherurethaneurea, Heparin, Prostaglandin I₂, Antithrombogenicity]

1 序論

血液と直接、接触して用いられる人工臓器の血栓形成を改善する実用的な手法の一つとして、人工臓器への生理活性物質の固定化がある。生理活性物質の中でも、血液凝固を抑制するヘパリンは、多くの研究者により用いられてきている^{1~4)}。また、血管壁内面を被っている血管内皮細胞から分泌されるプロスタグランジン I₂ (PGI₂) は血小板の吸着、凝集を強力に阻害する^{5, 6)}。これら2つの生理活性物質が固定化された高分子材料は、フィブリン生成と血小板の活性化を同時に阻害することが期待される。

一方、ポリウレタン類は、代表的な血液適合性材料の一つであり、多くの種類のポリウレタン類が、

これまでに合成されてきている^{7~9)}。抗血栓性材料のなかでも、ミクロ相分離表面構造^{10~12)}を形成するポリエーテルウレタンウレア (PEUU) は、血小板吸着と吸着血小板の形態変化を抑制する優れた性質を持ち、人工心臓のような心臓の人工器官に広く用いられている。

既報において、ヘパリン・PGI₂ 内包ヒドロゲルを担持したポリ塩化ビニル (PVC) が、ヘパリン・PGI₂ の徐放により、フィブリン生成と血小板吸着の二つの独立した血液凝固システムを抑制することを明らかにした¹³⁾。この抗血栓性材料の設計システムにおいて、マトリックスに、PVCに代えて、それ自身高い抗血栓性を有する PEUU を用いれば、その抗血栓性は更に増大することが期待される。

本報では、PEUU への生理活性物質（ヘパリン・PGI₂）の固定化と、その材料の血液凝固阻害能、血小板吸着阻害能をヒト・血液を用いた活性化部分トロンボプラスチン時間、血小板凝集試験、全血凝固時間により評価した結果を報告する。

2 実験

2.1 ポリエーテルウレタンウレア (PEUU) の合成

2.1.1 試薬

ポリテトラメチレングリコール (PTMG) は、保土谷化学工業(株)製 (分子量 2100) のものを 80℃で溶解し、減圧下、48 時間、乾燥して使用した。4,4'-ジフェニルメタンジイソシアネート (MDI) は、東京化成工業(株)製のものを使用した。1,2-ジアミノプロパンおよび、ジ-n-ブチルアミンは半井化学薬品(株)製のものを蒸留して使用した。ジラウリン酸ジ-n-ブチルスズは和光純薬工業(株)製のものを使用した。無水酢酸は、和光純薬工業(株)製のものを蒸留して使用した。N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) は、半井化学薬品(株)製のものを乾燥脱水ベンゼンと共沸させ、脱水減圧蒸留 (60℃, 35mmHg) して使用した。ベンゼンは、半井化学薬品(株)製のものを蒸留して金属ナトリウムで脱水乾燥して使用した。

2.1.2 PEUU の合成操作

フレンジングを行なった 200ml の四ツ口フラスコ内を窒素置換し、これに DMF 20ml と PTMG 5.25g を量り取り、攪拌しながら MDI 1.25g を加えて、80 分間、60℃で反応させてプレポリマーを合成した。次に滴下ロートより DMF 50ml を加え 0℃まで冷却し

て、鎖延長剤である 1,2-ジアミノプロパン 0.213ml と DMF 5ml を混合した溶液をゆっくりと 20 分間かけて滴下ロートを用い滴下して、20℃で 150 分間、反応させた。次に残存イソシアネート基を処理するためにジ-n-ブチルアミン 43 μl を加え、20 分間、攪拌し、更に過剰のジ-n-ブチルアミンを処理するために無水酢酸 24 μl を加え、10 分間、反応させ過剰のアミノ基を処理した。この反応溶液をメタノール中に滴下し、再沈を 3 回行い精製し、減圧乾燥することにより PEUU を得た(Fig. 1)。

2.2 ヘパリンおよび、プロスタグランジン I₂ (PGI₂) 誘導体を内包した微粒子状のアクリルアミド (AAM) 系ヒドロゲルの合成

2.2.1 試薬

ヘパリンは EASTMAN KODAK 社製のものを使用した。PGI₂ は東レ(株)製の PGI₂ 誘導体である TRK-100 を使用した。アクリルアミド (AAM)、N,N-メチレンビスアクリルアミド (bisA) および、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) は半井化学薬品(株)製の電気泳動用試薬を使用した。N-メチルアクリルアミド (NMAA) は興人(株)製のものを蒸留して使用した。N,N-ジメチルアクリルアミド (DMAA) および、N,N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド (DMPAA) は半井化学薬品(株)製のものを蒸留して使用した。過硫酸アンモニウム (APS) は半井化学薬品(株)製のものを使用した。

2.2.2 微粒子状の AAM 系ヒドロゲルの合成操作

微粒子状の AAM 系ヒドロゲルの合成は、低温で redox 開始剤 (APS, TEMED) を用い、また有機相にベンゼンを、界面活性剤にアラセル C を用いた乳化

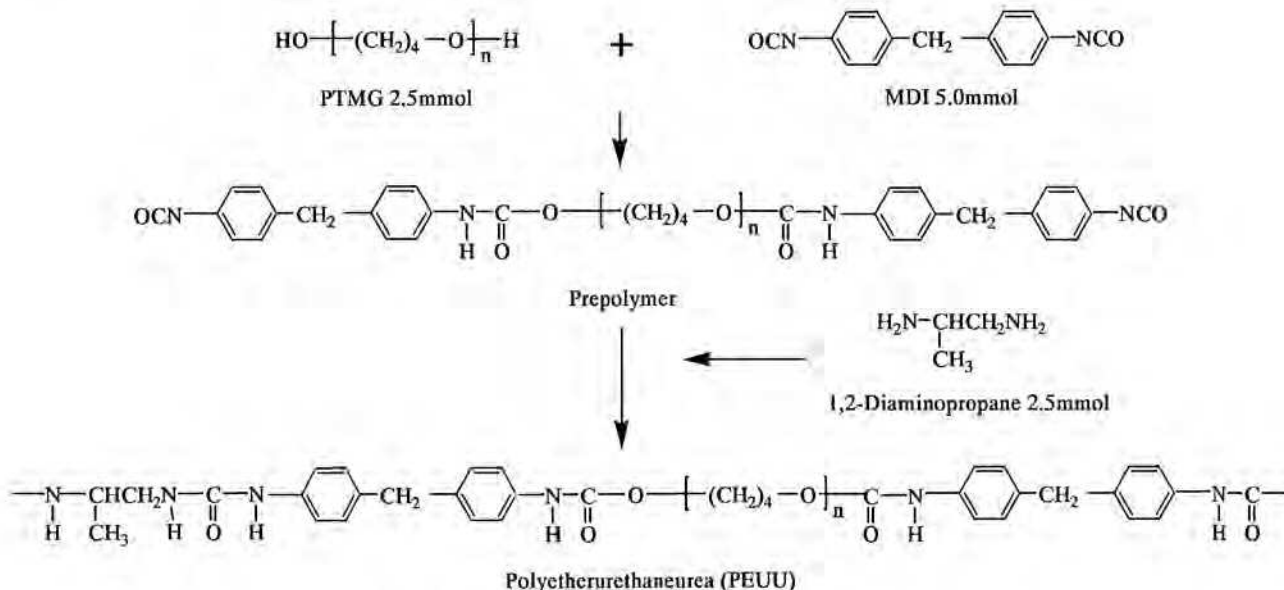


Fig. 1 Synthesis of polyetherurethaneurea(PEUU)

重合法により行なった。

200ml 容量の三ツロフラスコ中で、1%のアラセル C を含むベンゼン 200ml を攪拌しながら 10℃で 30 分間、窒素置換した。一方、AAm 系モノマーと APS および、ヘパリンあるいは、TRK-100 を含む水溶液に氷冷下で TEMED を加えたものを直ちに前述のベンゼン中に注ぎ込み、1 分間、超音波処理（トミー精工（株）製 UR-200P 型）した。これを徐々に室温に戻しながら、窒素気流下で 30 分間、攪拌した後、約 5 分間、静置し上澄みのベンゼンを除去しヒドロゲルをベンゼンで 3 回洗浄した。このヒドロゲル/ベンゼン分散液を液体窒素中で直ちに凍結させ、減圧下、乾燥させることにより微粒子状の AAm 系ヒドロゲルを得た (Table 1)。

Table 1 Preparation of Hydrogels with Heparin or PGI₂

Sample No.	Monomer (mg, (mmol))					Heparin (mg)	PGI ₂ (mg)
	AAm	DMA PAA	NMAA	DMAA	bisA		
1	377 (5.31)				4.3 (0.028)	200	none
2	362 (4.90)	16 (0.10)			4.0 (0.026)	200	none
3			381 (4.48)		3.5 (0.023)	200	none
4				383 (3.87)	3.0 (0.019)	200	none
5	1414 (19.9)				15 (0.10)	45	none
6	347 (4.90)	16 (0.10)			3.9 (0.025)	23	none
7			847 (9.95)		7.7 (0.05)	23	none
8				986 (9.95)	7.7 (0.05)	23	none
9	707 (9.95)				7.7 (0.05)	none	none
10	707 (9.95)				7.7 (0.05)	none	1.0
11			847 (9.95)		7.7 (0.05)	none	1.0
12				986 (9.95)	7.7 (0.05)	none	1.0

2.3 微粒子状の AAm 系ヒドロゲルを分散担持させた PEUU フィルムの調製

2.2 で得られたヘパリン・PGI₂ 誘導体を内包した微粒子状のヒドロゲル 50mg を PEUU の 10wt% DMF 溶液 4.5g 中に均一に分散させた後、これをガラス板上にキャストあるいは、血液試験用キュベットの内壁にコートし、24 時間、減圧乾燥することにより微粒子状のヒドロゲルを分散担持させた PEUU フィルムが得られた。

2.4 活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) の測定

活性化部分トロンボプラスチン時間 (Activated partial thromboplastin time ; aPTT) は、血漿の凝固系反応の全過程の凝血時間であり、凝固系のカスケー

ド反応が阻害されれば aPTT が延長される。

新鮮なヒト・全血とチトラート[®] (ミドリ十字 (株) 製) の 9:1 混和液を遠心分離 (800rpm, 10min) することによりヒト・血漿が得られ、更にこれを遠心分離 (4500rpm, 10min) し、血小板がほとんど含まれない貧血小板血漿 (PPP) が得られた。2.3 で調製された血液試験用カップに貧血小板血漿 100μl とパトロンチン[®] (Hoechst (株) 製、微粒子化したカオリンを含むウサギ脳由来のリン脂質溶液) 100μl を加え、37℃で 2 分間インキュベートした後、0.05M-CaCl₂ を 100μl 加えることにより凝固系のカスケード反応を開始させる。CaCl₂ 溶液添加から凝固するまでの時間 (aPTT) をフィブrometer を用いて測定した。

2.5 血小板凝集阻止能の評価

血小板が多く浮遊する血漿 (多血小板血漿 ; PRP) に血小板凝集を誘起する物質 (コラーゲン、トロンビン) が添加されると血小板が粘着・凝集し血漿中に凝集塊が生成し PRP の透過率が增大する。つまり、血小板の凝集が阻止されれば透過率の増大は抑制される。

新鮮なヒト・全血とチトラート[®] の 9:1 混和液を遠心分離 (800rpm, 10min) し、PRP が得られた。2.3 で調製された血液試験用ガラスチューブに PRP 250μl を加え、37℃で 1 分間インキュベートした後、10unit/ml のコラーゲン溶液 5μl を添加して、その後、10 分間の透過率の変化を測定した。

2.6 全血凝固時間の測定

ヒト・血液を採血後、直ちに 2.3 で調製された血液試験用ガラスチューブの中に泡立たないように 0.5ml 入れて、血液を血液試験用ガラスチューブに入れた時間を t=0 とし、それから 30 秒毎に傾けて凝固するまでの時間を全血凝固時間とした。

2.7 ヘパリンの放出挙動の測定

2.7.1 試薬および、使用機器

セチルピリミジウムクロライド (CPC)、塩化ナトリウムは半井化学薬品 (株) 製のものを使用した。フローインジェクション装置は日立製作所 (株) 製 K-1000 型を使用した。インテグレーターは日立製作所 (株) 製 D-2000 型を使用した。検出器はガスクロ工業 (株) 製 502T 型を使用した。

2.7.2 測定方法

ヘパリンを含有する試料ガラスチューブに生理的食塩水を加えて、この中に放出されるヘパリンの量を、フローインジェクション装置を用いて、所定時

間毎に試料ガラスチューブ中の生理的食塩水をサンプリングし、これをCPC溶液と混合し、その際、生成するヘパリン-CPC錯体による濁り度をフローセルを備えた分光光度計で測定した。

2.8 PEUUの引張り強度の測定

2.3で得られたPEUUフィルムを10×50mmの形状に切り出し、万能型引張り試験機を用いて室温、伸張速度1mm/minで測定した。

3 結果および考察

3.1 ヘパリンによる凝固系抑制の評価

ヘパリンを含有するPEUUがコートされた血液試験用カップを用いてaPTTの測定を行なった。血液試験用カップに生理的食塩水を注ぎ、所定時間後、これを廃棄し、貧血小板血漿を用いて測定した結果をTable 2に示す。ヘパリンを含有するPEUU試料(Run No. 1, Run No. 2, Run No. 3, Run No. 4)は、ヘパリンを含まないPEUU試料(Run No. 5)と比較して72時間後においても60秒以上と、aPTTを大幅に延長しており、ヘパリンが長期にわたり放出され凝固系の活性化を抑制していることがわかる。これは親水性生理活性物質であるヘパリンをヒドロゲルを介してPEUUに固定化することで、長期のヘパリン徐放が達成されたためと考えられる。

Table 2 aPTT of PEUU with Heparin-Immobilized Hydrogels^{a)}

Run No.	Hydrogels	Component of Gel	Heparin (μg)	aPTT (s)			
				0hr	24hr	48hr	72hr
1	Sample No.5	AAm	3.12	>60	>60	>60	>60
2	Sample No.6	AAm-DMAPAA	23.4	>60	>60	>60	>60
3	Sample No.7	NMAA	10.1	>60	>60	>60	>60
4	Sample No.8	DMAA	8.76	>60	>60	>60	>60
5	Sample No.9	AAm	none	41	39	35	38

a) Hydrogel / (Hydrogel + PEUU) = 10 wt%

3.2 PGI₂による血小板凝集阻止能の評価

PGI₂を含有するPEUUがコートされた血液試験用ガラスチューブを用いて血小板凝集による経時的なPRPの透過率の変化を測定した(Fig. 2)。このコラーゲン誘起による血小板凝集挙動は、透過率が高いほど血小板が凝集していることを示し、PRPの透過率を0%、PPPの透過率を100%として示している(Fig. 2中のControlはPEUUポリマーがコートされていない血液試験用ガラスチューブの結果である)。

また、下記の式より算出した血小板凝集阻止能の結果をTable 3に示す。PGI₂を含有するPEUU試料

$$\text{Degree of inhibition (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A; T% of Run No. 9 B; T% of Run No. 6, 7, 8

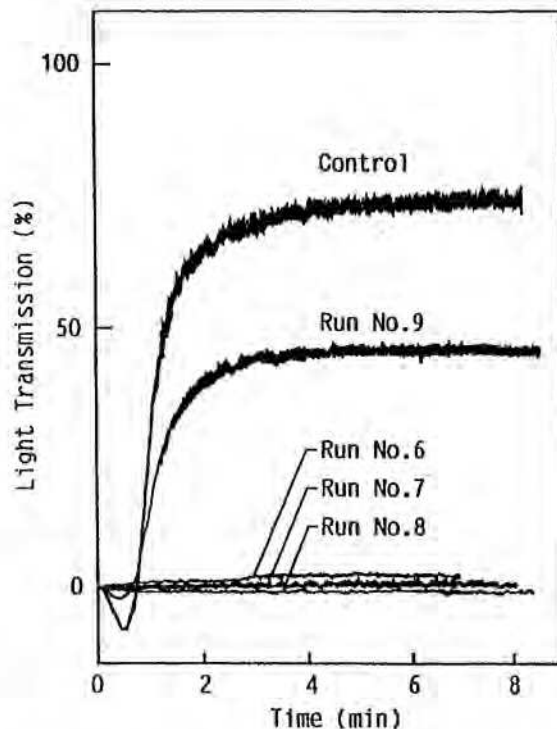


Fig. 2 Platelet aggregation curves for PRP exposed to PEUU with PGI₂-immobilized hydrogels

(Run No. 6, Run No. 7, Run No. 8)は、PGI₂を含まないPEUU試料(Run No. 9)と比較して72時間後においても血小板凝集を完全に阻止しており、PGI₂が長期にわたり放出され血小板系の活性化を抑制していることがわかる。

Table 3 Inhibition of Platelet Aggregation of PEUU with PGI₂-Immobilized Hydrogels^{a)}

Run No.	Hydrogels	Component of Gel	PGI ₂ (μg)	Degree of Inhibition (%)			
				0hr	24hr	48hr	72hr
6	Sample No.10	AAm	0.52	100	100	100	100
7	Sample No.11	NMAA	0.34	100	100	100	100
8	Sample No.12	DMAA	0.29	100	100	100	100
9	Sample No.9	AAm	none	0	0	0	0

a) Hydrogel / (Hydrogel + PEUU) = 10 wt%

3.3 全血凝固時間による抗血栓性の評価

ヘパリンあるいは、PGI₂を含有するPEUUがコートされた血液試験用ガラスチューブを用いて全血凝固時間の測定を行なった。血液試験用ガラスチューブに生理的食塩水を注ぎ、所定時間後、これを廃棄

Table 4 Whole Blood Clotting Time of PEUU with Heparin- and/or PGI₂-Immobilized Hydrogels^{a)}

Run No.	Hydrogels	Heparin (mg)	PGI ₂ (μg)	Whole Blood Clotting Time (min)			
				0hr	24hr	48hr	72hr
10	Sample No.5	10.2	none	>45	>45	>45	>45
11	Sample No.10	none	0.52	14	12	12	12
12 ^{b)}	Sample No.5 + Sample No.10	8.18	0.09	>45	>45	>45	>45
13 ^{c)}	Sample No.5 + Sample No.10	7.30	0.33	>45	>45	>45	>45
14	Sample No.9	none	none	11	9	12	12

a) Hydrogel / (Hydrogel + PEUU) = 10 wt% b) Sample No.5 / Sample No.10 = 4 / 1 (wt / wt)

c) Sample No.5 / Sample No.10 = 1 / 1 (wt / wt)

し、採血直後の血液を注ぎ測定した結果を Table 4 に示す。ヘパリンを含有する PEUU 試料 (Run No. 10, Run No. 12, Run No. 13) は、ヘパリンを含まない PEUU 試料 (Run No. 11, Run No. 14) と比較して、かなり全血凝固時間を延長している。このことより、血栓形成は血小板系の活性化よりも凝固系の活性化に依存していることが推察される。

これら 3 つの血液試験の結果 (Table 2, Table 3, Table 4) より、ヘパリンあるいは、PGI₂ 誘導体である TRK-100 をヒドロゲルを介して PEUU に担持した材料は、in vitro において高い抗血栓性を有していることが明らかとなった。

3.4 ヘパリンの放出挙動

125-200μg のヘパリンをヒドロゲルを介して担持した PEUU フィルムからのヘパリンの放出挙動について検討した結果を Fig. 3 に示す。ヒドロゲルのカチオン性の強弱により、高密度に負に帯電したヘパリンの放出量を、うまく制御している。また、ヘパリンをヒドロゲルを介さずに直接 PEUU フィルムに担持させたもの (Heparin / PEUU mixture) は、ヘパリンの放出率が高くなっている。一方、カチオン性モノマーとして知られている DMAPAA を含むヒドロゲルを担持した PEUU (Sample No.2) は、ヘパリンの放出率を低く抑えている。

3.5 PEUU の引張り強度

2 種の AAm 系モノマーから調製した微粒子状ヒドロゲルを分散保持した PEUU フィルムの応力-ひずみ挙動を Fig. 4 に示す。ヒドロゲルを分散保持させることにより、引張り強度は多少弱くなっているが、著しい劣化ではない。一方、破断伸びはヒドロゲルを分散保持させても、あまり変わらない。むしろ、増大している。

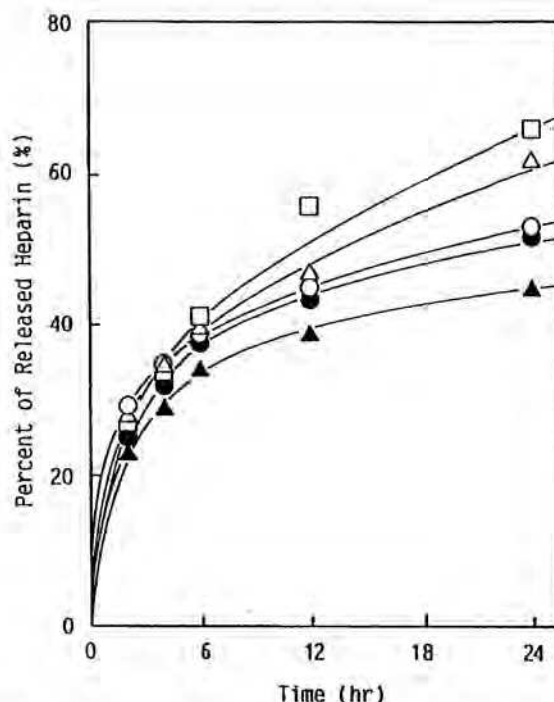


Fig. 3 Release behavior of heparin from PEUU with heparin-immobilized hydrogels at 37°C in a physiological saline (□) Heparin/PEUU mixture, (△) Sample No.1, (○) Sample No.3, (●) Sample No.4, (▲) Sample No.2

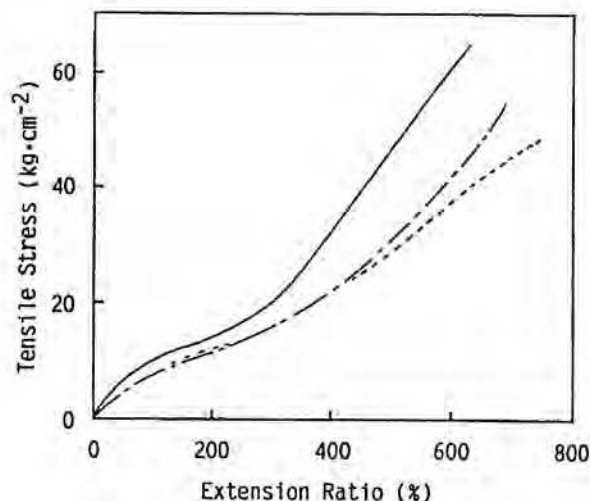


Fig. 4 Stress-strain curves of PEUU with hydrogels (—) PEUU only, (---) Run No.3, (- - -) Run No.4

4 結論

本研究では、それ自身高い抗血栓性をもつと言われているポリエーテルウレタンウレア (PEUU) の合成を行ない、より高い抗血栓性を付与するために、

血栓形成を阻害する作用を持つヘパリンあるいは、TRK-100 (PGI₂ 誘導体) を内包するアクリルアミド系ヒドロゲルを PEUU に担持し、その抗血栓性について検討した。

3種の血液試験によりヒドロゲルを介してヘパリンあるいは、TRK-100 を PEUU に担持した抗血栓性材料は、*in vitro* において優れた抗血栓性を有していることが明らかとなった。これはヒドロゲルと生理活性物質（ヘパリン、TRK-100）の親和性により、ヘパリンあるいは、TRK-100 が長期にわたり徐放されたためと考えられる。

全血凝固時間の測定結果より血栓形成には、血小板系より凝固系の活性化が大きく関与していることが示唆された。

また、ヒドロゲルの種類を変えることにより、高密度に負に帯電したヘパリンの放出量を、うまく制御できることがわかった。

さらに、PEUU へのヒドロゲル分散添加は、PEUU 本来の優れた機械的強度に、影響を与えないことがわかった。

謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導と御助言を御教授賜りました大阪大学大学院工学研究科明石満教授、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科丸山征郎教授に心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) H. Tanzawa, Y. Mori, N. Harumiya, H. Miyama, M. Hori, N. Ohshima, and Y. Idezuki : Preparation and Evaluation of a New Antithrombogenic Heparinized Hydrophilic Polymer for use in Cardiovascular System, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Org.*, XIX, pp.188-194, 1973
- 2) J. Y. Lin, C. Nojiri, T. Okano, and S. W. Kim : Minimum Heparin Release Rate for Nonthrombogenicity, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Org.*, XXXIII, pp.602-605, 1987
- 3) H. Miyama, N. Fujii, A. Kuwano, S. Nagaoka, Y. Mori, and Y. Noishiki : Antithrombogenic Heparinized Polyacrylonitrile Copolymer, *J. Biomed. Mater. Res.*, 20, pp.895-901, 1986
- 4) C. D. Ebert, and S. W. Kim : Immobilized Heparin - Spacer Arm effects on Biological Interaction, *Thromb. Res.*, 26, pp.43-57, 1982
- 5) J. Aiken : Prostaglandins, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 6, pp.5413-5420, 1984
- 6) B. Whittle, S. Moncada, and J. R. Vane : Comparisons of the effect of PGI₁ and PGD₂ on Platelet Aggregation in different species, *Prostaglandins*, 16, pp.373-388, 1978
- 7) R. Shibuta, M. Tanaka, M. Sisido, and Y. Imanishi : Synthesis of novel polyaminoetherurethaneureas and development of antithrombogenic material by their chemical modifications, *J. Biomed. Mater. Res.*, 20, pp.971-987, 1986
- 8) Y. Ito, M. Sisido, and Y. Imanishi : Synthesis and antithrombogenicity of polyetherurethaneurea containing quaternary ammonium groups in the side chains and of the polymer/heparin complex, *J. Biomed. Mater. Res.*, 20, pp.1017-1033, 1986
- 9) E. W. Merrill, E. W. Salzman, S. Wan, N. Mahmud, L. Kushner, J. N. Lindon, and J. Curme : Platelet-compatible hydrophilic segmented polyurethanes from polyethylene glycols and cyclohexane diisocyanate, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Org.*, XXVIII, pp.482-487, 1982
- 10) N. Yui, K. Kataoka, Y. Sakurai, T. Aoki, K. Samui, and N. Ogata : In vitro and in vivo studies on antithrombogenicity of poly(propylene oxide) segmented nylon 610 in relation to its crystalline-amorphous microstructure, *Biomaterials*, 9, pp.225-229, 1988
- 11) V. I. Sevastianov, R. C. Eberhart, and S. W. Kim : Influence of Mold Properties on Surface Structure of a polyurethane-Siloxane Block Co-polymer - Implications for Blood Compatibility, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Org.*, XXXIV, pp.10-18, 1988
- 12) D. W. Grainger, C. Nojiri, T. Okano, and S. W. Kim : In vitro and ex vivo platelet interactions with hydrophilic-hydrophobic poly(ethylene oxide)-polystyrene multiblock copolymers, *J. Biomed. Mater. Res.*, 23, pp.979-1005, 1989
- 13) M. Akashi, S. Takeda, T. Miyazaki, E. Yashima, N. Miyauchi, I. Maruyama, T. Okadome, and Y. Murata : Antithrombogenic Poly(vinyl chloride) with Heparin- and/or Prostaglandin I₂-Immobilized in Hydrogels, *J. Bioactive and Compatible Polym.*, 4, pp.4-16, 1989