

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18300158
 研究課題名（和文）糖鎖ポリマーのナノ相分離構造を利用した
 抗血栓性コーティング材料の創製
 研究課題名（英文）Construction of Blood-Compatible Surface Based on Phase Separation
 Property of Glycoconjugated Polymer
 研究代表者
 覚知 豊次（KAKUCHI TOYOJI）
 北海道大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：80113538

研究成果の概要：ヒト・動物由来の医用材料の使用は牛海綿状脳症（BSE）やC型肝炎、さらに未知感染症に繋がるおそれがあるため、現在医用材料として用いることが強く規制されている。従って、動物由来の原料に依存しない安全な代替合成医用材料の開発が強く求められている。本研究では、糖鎖末端ポリマーを精密合成し、このポリマーを抗血栓性コーティング材料として応用することを目指した。抗血栓性に対して最も重要な因子である糖鎖ナノスポットの構造は任意に調節可能であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：リビングラジカル重合、糖鎖ポリマー、コーティング、高分子ミセル、マイクロ相分離構造、抗血栓性、生体適合性

1. 研究開始当初の背景

ヒト・動物由来の材料が医療分野で重要な役割を果たしている。例えば、血液凝固因子を阻害する生理活性を示すヘパリンを固定化した材料が1980年代に盛んに開発され、抗血栓性材料として医療機関で広く用いられている（ヘパリンは牛の肺や豚の腸粘膜などの哺乳類の動物組織から作製される生物由来の材料である）。

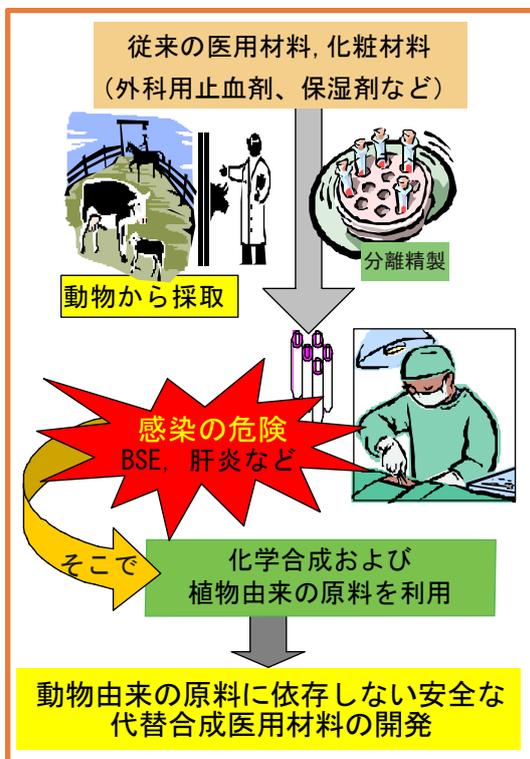
ヘパリン固定化材料が抗血栓性材料として開発される以前に、両親媒性ポリマーから

なる50ナノメートル前後の親水部と疎水部との相分離構造（マイクロ相分離構造）が、血栓形成の引き金である「血小板細胞表面に島状に存在する親水性タンパク質（直径5～8.5ナノメートル）同士の凝集」を促さない、すなわち、抗血栓性を示すという結果が報告されていた。しかし、ヘパリン固定化材料が一定の性能を発揮したため、抗血栓性材料あるいは抗血栓性の発現方法に関する新たな研究は減少の一途を辿ってきた。

こうした中、牛海綿状脳症（BSE）やC型

肝炎が世界中で蔓延し、ヒト・動物由来の材料の使用が未知感染症の恐れから問題視され始めた。2003年7月にはついに薬事法改正が施行され、「生物由来製品（主に動物に由来する原料又は材料を用いた製品）」および「特定生物由来製品（主にヒトの血液や組織に由来する原料又は材料を用いた製品）」という枠組みが新しく設けられ、ヘパリンの他、抗血栓性の付与で使用されてきたヒト血清アルブミン、ヒトの尿から精製するウロキナーゼもこれに指定され使用が規制された。ヘパリン固定化材料に関しては、承認取得はおろか、既に承認取得した製品の形状追加などの一部変更承認すら困難になっている。

しかしながら、これらに替わる合成材料で、ヘパリン固定化材料と同等の機能を持つ材料はほとんどないのが現状であり、抗血栓性を示す安全な代替合成医用材料の開発が急務になっていた（下図）。



2. 研究の目的

以上を背景として本研究では、糖末端ポリスチレンの精密合成に関する研究を行う。予想される有機溶媒中での親水部の自己集合による高分子逆ミセルの形成、およびその状態を保った溶液による製膜によって、ポリ塩化ビニル、シリコン、およびポリスルホンなどの汎用高分子の表面に植物と合成ポリマーに由来する親疎水性のマイクロ相分離構造を構築する。未知の感染症に罹患する恐れのない合成医用材料を開発する上で、その基盤となる知見を得ることを目的とする。

具体的には、糖を有するリビングラジカル重合の開始剤を合成する。これを用いたスチレンの重合を行い、糖鎖を末端に有するポリスチレン（糖末端ポリスチレン）の合成を行う。糖末端ポリスチレンの有機溶媒中での親水部（糖ユニット）の自己集合による高分子逆ミセルの形成能を調べる。逆ミセルの会合数や分子量は製膜後の親疎水性のマイクロ相分離構造のサイズや密度を制御する重要なパラメーターであると考えた。そこで糖鎖としてグルコース（単糖）の他、マルトオリゴ糖（デンプンを起源とするオリゴ糖で、グルコースが2～6分子連結した2～6糖）を用いる。さらにポリマー鎖長を重合により制御する。これらの高分子逆ミセル形成能を明らかにする。

さらに、得られた糖末端ポリスチレンから有機溶媒中で高分子逆ミセルを調整し、材料表面にキャストした。構築されたポリマーコーティングの形態学的な観察を透過型顕微鏡により行い、相分離構造のサイズと再現性について評価する。また、親水性やポリマー鎖長の異なるサンプルを用いた実験から、ポリマーの分子設計と親疎水ナノ相分離構造の形成能の相関を明らかにする。

3. 研究の方法

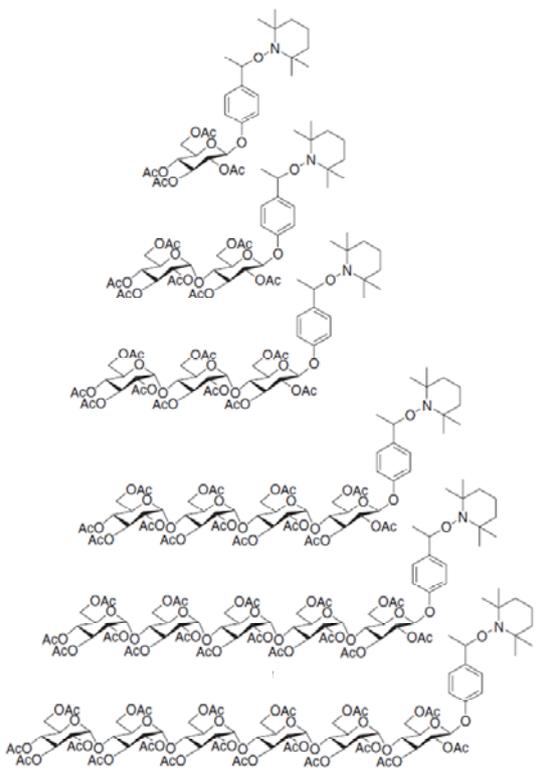
(1) アルコキシアミンすなわち「安定ニトロキッドによるリビングラジカル重合の開始剤」にアセチル化グルコースを化学結合した化合物を合成した。これを用いてスチレンの重合を行い、次に得られた生成物をナトリウムメトキッドで処理し、末端にグルコースを有するポリスチレンを合成した。同様にグルコースが2、3、4、5、および6分子連結したマルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、およびマルトヘキサオースを化学結合したアルコキシアミン誘導体を合成し、糖鎖長の異なるオリゴ糖を末端に有するポリスチレンを合成した。また開始剤とスチレンの仕込み比を変えることによりポリマー鎖長の異なる、すなわちスチレンの重合度が約50、100、および200のサンプルを合成した。得られた18サンプルのトルエン中での逆ミセル形成能を静的光散乱測定によって評価した。

(2) ポリマーを種々の溶媒を用いて汎用樹脂成形物にコーティングし、膜厚、むら、および接着強度等を測定する。汎用樹脂成形物としては、血液製剤の寿命を延長する目的で莫大な需要が予想される血小板輸血パックと、人工心肺や人工透析装置の体外血液循環回路内を想定した実験を計画している。樹脂成形物に均一に製膜出来る溶媒と条件を確立することで、抗血栓性など他の評価を再現性良く実施するための試料調製法について

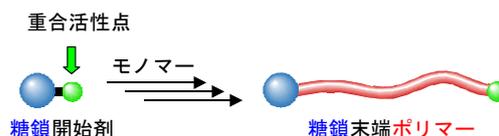
も模索する。以上は、将来の工業的規模での生産技術の開発に資する重要な治験であるので、雰囲気、溶剤濃度の影響とゾルゲル転換の速度の影響について特に詳細に把握する。また、樹脂の形状や種類によってはコーティングに難を要することも予測されるが、その場合、使用時の変形許容度、吸湿性、曲げ剛性、動的粘弾性、および分解生成物に考慮してポリマー鎖の種類そのものを変えて比較検討し解決する。

4. 研究成果

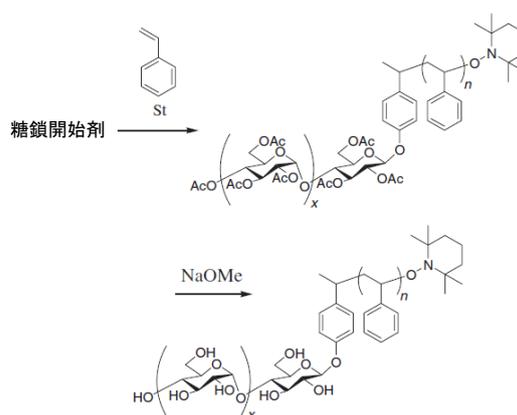
単糖、2糖、3糖であるグルコース、マルトース、およびマルトトリオースは1) アセチル化、2) アノマー位の選択的脱アセチル化、3) トリクロロアセトイミド化、4) 4-エチルフェノールのグリコシル化を行い、最後に5) ベンジル位への2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシルの付加反応を行い、それぞれの糖鎖を有するリビングラジカル重合の開始剤に変換した。4糖、5糖、および6糖であるマルトテトラオース、マルトペンタオース、およびマルトヘキサオースに関しては、アセチル化した α -シクロデキストリンを無水酢酸中、濃硫酸により開環し（アセトキシ反応）、それにより得られたそれぞれのアセチル化糖鎖誘導体を用いて上記と同様の反応を行った。最終的に糖鎖長の異なる6種類のリビングラジカル重合の開始剤を合成した（下図）。



次に得られた開始剤を用いてスチレンの塊状重合を 120°C で 6 時間行い白色粉末の生成物を得た。収率はどの開始剤を用いた場合も約 40%であった。スチレンと開始剤をモル比 125/1 で仕込んだ重合で得られた生成物は数平均分子量および分子量分散度がそれぞれ 4800~6300 および 1.09~1.12 のポリマーであった。生成物の ¹H NMR 測定では糖鎖に由来するプロトンのシグナルが観測された。以上より生成物は末端にそれぞれの糖鎖を有するポリスチレンであると同一した。糖鎖による末端修飾率はほぼ 100%であることが ¹H NMR および FID 検出器を装備した薄層クロマトグラフィーにより示された。またスチレンと開始剤をモル比 250/1 および 500/1 で仕込むことによって数平均分子量がそれぞれ 8900~10600 および 18500~25200 かつ分子量分散度が 1.18 以下のサンプルが得られた。最終的にグルコースユニットが 1、2、3、4、5、および 6、ポリスチレンの重合度が約 50、100、および 200 に制御された 18 種類のポリマーサンプルを合成した（下図）。



生成物の脱アセチル化反応をナトリウムメトキシドにより行い、末端に親水性の糖鎖を有する両親媒性のポリスチレンに変換した（下図）。



このポリマーはトルエン、クロロホルム、およびテトラヒドロフランなどのポリスチレンの良溶媒中で、糖鎖をコア、ポリスチレンをシェルとする逆ミセル状の集合体として存在することが ¹H NMR および動的光散乱測定により示された。

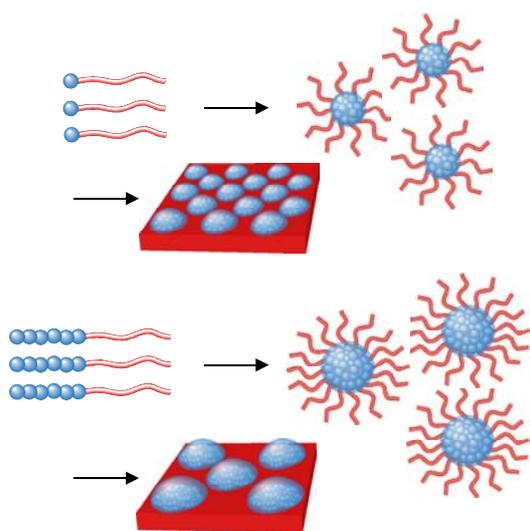
逆ミセルの会合数や分子量は糖鎖ナノス

ポットのサイズや密度を制御する重要なパラメータであると考えた。そこで逆ミセル系性能とポリマーの一次構造との相関を見出すために静的光散乱測定を行った。その結果、糖鎖長を増加させるほど会合数の大きな逆ミセルを形成することが可能であることが示された。いっぽう、ポリスチレンの重合度を増加させた場合には、逆ミセルの分子量に大きな変化はみられず、そのかわり会合数が減少することがわかった。

この高分子逆ミセルの溶液をキャストすることにより親水性すなわち糖鎖のナノスポットを有するフィルムが得られることが透過型顕微鏡観察より明らかとなった（下図）。



集合状態にあるポリマー溶液から作成したフィルムは、表面層のみならず断面全体に亘って約50ナノメートルの親疎水相分離構造を有していることがわかった。溶液中での逆ミセル形成能と相関して、ポリマーフィルム中の糖鎖ナノスポットの形状もまたポリマーの一次構造に依存していた（下図）。



この構造は、溶媒の組み合わせによって大

きな影響を受けないことから、工業的規模での製膜でも広範囲にかつ再現性良く表面微細構造を作成することが出来る可能性が高い。基盤化合物である糖鎖開始剤についても、前駆体を経由する安全かつ独自の合成ルートを構築済みで、ほとんどの前駆体及び糖開始剤が保存に適した安定な固体であることがわかっている。また、用途を想定してビニルモノマーを選択することも容易であって、例えば、使用時の変形許容度、吸湿性、曲げ剛性、動的粘弾性、および分解生成物に考慮して選択変化することができる。以上のように、優れた素質を持つ抗血栓性材料の創製に向けた戦略が、既に構築されている。以上は抗血栓性材料の開発に繋がる重要な知見であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計10件）

- ① Cristiano Giacomelli, Vanessa Schmidt, Jean-Luc Putaux, Atsushi Narumi, Toyoji Kakuchi, Redouane Borsali, "Aqueous Self-Assembly of Polystyrene Chains End-Functionalized with β -Cyclodextrin" *Biomacromolecules*, **10**(2), 449-453 (2009) 査読有
- ② Atsushi Narumi, Toyoji Kakuchi, "Synthesis of Glycoconjugated Branched Macromolecular Architectures" *Polym. J.*, **40**(5), 383-397 (2008) 査読有
- ③ Otsuka, I., Sakai, R., Kakuchi, R., Satoh, T., Kakuchi, T. Chiroptical switching system based on the host-guest interaction between metal cations and poly(phenylacetylene)s bearing polycarbohydrate ionophore. *Eur. Polym. J.*, **44**, 2971-2979 (2008). 査読有
- ④ Kitajyo, Y., Imai, T., Sakai, Y., Tamaki, M., Tani, H., Takahashi, K., Narumi, A., Kaga, H., Kaneko, N., Satoh, T. and Kakuchi, T. Encapsulation-Release Property of Amphiphilic Hyperbranched D-Glucan as a Unimolecular Reverse Micelle Polymer, *Polymer*, **48**(5), 1237-1244 (2007). 査読有
- ⑤ Kitajyo, Y., Nawa, Y., Tamaki, M., Tani, H., Takahashi, K., Kaga, H., Satoh, T. and Kakuchi, T. A Unimolecular Nanocapsule. Encapsulation Property of Amphiphilic Polymer Based on Hyperbranched Polythreitol, *Polymer*, **48**(16), 4683-4690 (2007). 査読有

- ⑥ Kitajyo, Y., Kinugawa, Y., Tamaki, M., Kaga, H., Kaneko, N., Satoh, T., and Kakuchi, T., Synthesis, Characterization, and Functionalization of Hyperbranched Poly(3,4-epoxycyclohexanemethanol), *Macromolecules*, **40**(26), 9313-9321(2007). 査読有
- ⑦ Narumi, A., Kaga, H., Miura, Y., Satoh, T., Kaneko, N., Kakuchi, T., "Synthesis of polystyrene microgel with glucose as hydrophilic segment via controlled free-radical polymerization". *Polymer*, **47**(7), 2269-2273 (2006) 査読有
- ⑧ Narumi, A., Kaga, H., Miura, Y., Otsuka, I., Satoh, T., Kaneko, N., Kakuchi, T. "Polystyrene Microgel Amphiphiles with Maltohexaose. Synthesis, Characterization, and Potential Applications", *Biomacromolecules*, **7**(5), 1496-1501 (2006) 査読有
- ⑨ Narumi, A., Miura, Y., Otsuka, I., Yamane, S., Kitajyo, Y., Satoh, T., Hirao, A., Kaneko, N., Kaga, H., Kakuchi, T., "End-functionalization of polystyrene by malto-oligosaccharide generating aggregation-tunable polymeric reverse micelle". *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **44**(16), 4864-4879(2006). 査読有
- ⑩ Narumi, A.; Otsuka, I., Matsuda, T., Miura, Y., Satoh, T., Kaneko, N., Kaga, H., Kakuchi, T., "Glycoconjugated polymer: synthesis and characterization of poly(vinyl saccharide)-block-polystyrene-block-poly(vinyl saccharide) as an amphiphilic ABA triblock copolymer". *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **44**(13), 3978-3985(2006). 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Toyoji Kakuchi, Synthesis of hyperbranched Carbohydrate Polymer, Taiwan-Japan International Symposium on Organic Chemistry and Molecular Science April 18-20, 2008 National Taipei University of Technology Taipei, Taiwan.
- ② R. Konosu · T. Hongo · I. Otsuka · A. Narumi · T. Satoh · A. Deffieux · A. Hirao · T. Kakuchi, Synthesis and characterization of poly(p-phenylene ethynylene) bearing malto-hexaose, *235th American Chemical Society*

National Meeting, April 6, 2008, Morial Convention Center – Hall A, New Orleans, LA, USA.

- ③ 本郷孝剛・大塚一世・堺井亮介・鳴海敦・佐藤敏文・Alain Deffieux・平尾明・覚知豊次 マルトオリゴ糖を側鎖に有するポリフェニルアセチレンの合成とキラル特性第 56 回 高分子討論会 2007/9/19-21・名古屋工業大学
- ④ 鴻巣亮・本郷孝剛・大塚一世・鳴海敦・佐藤敏文・Alain Deffieux・平尾明・覚知豊次 マルトヘキサオースを側鎖に有する π 共役高分子の合成とレクチン認識能第 56 回 高分子討論会 2007/9/19-21・名古屋工業大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

覚知 豊次 (KAKUCHI TOYOJI)
北海道大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：80113538

(2) 研究分担者

佐藤 敏文 (SATO TOSHIFUMI)
北海道大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：80291235
堺井 亮介 (SAKAI RYOSUKE)
北海道大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：90507196

(3) 連携研究者

なし