

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19750085  
 研究課題名（和文）糖末端ポリスチレンの親水部自己集合を利用した  
 血液接触面コート剤の開発  
 研究課題名（英文）Construction of Blood-Compatible Surface Utilizing Self-Assembling  
 Property of End-Glycosyl Polystyrene  
 研究代表者  
 鳴海 敦（NARUMI ATSUSHI）  
 山形大学・大学院理工学研究科・助教  
 研究者番号：60443975

研究成果の概要：糖鎖長と重合度の異なる 18 種類の糖末端ポリスチレンを合成した。これらはポリスチレンの良溶媒中で糖およびポリスチレンをそれぞれコアおよびシェルとする逆ミセル状の集合体として存在すること、さらにこの高分子逆ミセル溶液のキャストによりシリコン表面に植物と合成ポリマーに由来する親疎水性のミクロ相分離構造を構築することが可能であることを示した。以上は抗血栓性を示す代替合成材料の開発に役立つ知見に成り得ると考えている。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：リビングラジカル重合、糖修飾ポリマー、両親媒性制御、高分子ミセル、ミクロ不均質構造、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（ミクロ相分離構造）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、医療分野でのヒト・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。

## 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のキャスト」により、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。

具体的には以下を行う。

(1) 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。

(2) ポリスチレン (A) および糖をペンダントに有するポリスチレン (B) から構成される AB ジブロックコポリマー (糖修飾ポリスチレンブロックコポリマー) の合成を行い、その高分子逆ミセル形成能について評価を

行う。(1) に比べ、こちらのタイプのポリマーは B の重合度を大きくすることで、糖含有量の高い、すなわち親水性の高いポリマーを合成することができる点が特色である。そこで、この糖修飾ポリスチレンブロックコポリマーに関しては有機溶媒中での高分子逆ミセル形成能だけでなく、水中での A セグメントをコアおよび B セグメントをシェルとする高分子ミセルの形成能についても評価を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド (TEMPO) 付加体すなわち「安定ニトロキシドによるリビングラジカル重合 (nitroxide-mediated controlled radical polymerization: NMP) 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である「糖修飾開始剤」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シドで処理し、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有する糖修飾開始剤を合成し、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) スチレンの重合を開始剤に 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド (TEMPO) 付加体を用いて行い、末端に TEMPO を有するポリスチレン (PS-TEMPO) を合成した (末端から NMP を開始することが可能である)。次に PS-TEMPO を用いてアセチル化グルコースを有するスチレン (糖モノマー) の重合を行った。生成物を水酸化テトラメチルアンモニウムで処理して脱アセチル化し、ポリスチレン (A) および糖を側鎖に有するポリスチレン (B) から構成される AB ジブロックコポリマー (糖修飾ポリスチレンブロックコポリマー) を得た。最終的に A セグメントの鎖長が 90 および B セグメントの鎖長が 2、3、6、14、32、37 の糖修飾ポリスチレンブロックコポリマーを合成し、それらの溶解性および高分子集合体の形成能について調べた。

## 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デート化、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 $\alpha$ -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。

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<sup>1</sup>H 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特定した。糖鎖による末端修飾率はほぼ100%であることが<sup>1</sup>H 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。

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。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<sup>1</sup>H NMRおよび動的光散乱測定により示された。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。

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ーであると考えた。そこで逆ミセル形成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、すなわち糖鎖スポットのサイズを増加させることが可能であることが示された。一方、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。すなわち後者の分子設計は糖鎖スポットのサイズおよび密度を減少させる場合に有効な手段であることが示唆された。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。

2) 末端にTEMPOを有するポリスチレン(PS-TEMPO)を用いてアセチル化グルコースを有するスチレン(糖モノマー)の重合を行った。重合はクロロベンゼン中、重合促進剤として過酸化ジクミルを用い、120で5時間行った。異なる糖含有量のサンプルを合成するためにPS-TEMPOと糖モノマーの仕込み比を変化させた。反応混合物を再沈澱により精製し、40~60%の収率で白色粉末の生成物を得た。生成物の<sup>1</sup>H NMR測定では7.5~6.0および2.5~1.0 ppmにポリスチレンの芳香環および主鎖のメチンおよびメチレンのプロトンに由来するシグナルが観測された。さらに5.5~3.5 ppmおよび2.2~1.8 ppmに糖モノマーユニットのメチン・メチレンおよびアセチル基のメチルに由来するプロトンのシグナルが観測された。生成物のサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)は単峰性であった。したがって生成物はポリスチレンと糖モノマー由来のホモポリマーの混合物ではない、すなわちブロックコポリマーが生成したことが示された。生成物の数平均分子量および分子量分散度はそれぞれ14000~16000および1.24~1.35のポリマーであった。

続いて生成物の脱アセチル化を1,4-ジオキサン中、水酸化テトラメチルアンモニウムを用いて行った。反応混合物を透析により精製した後、凍結乾燥を行い、ポリスチレン(A)および糖をペンダントに有するポリスチレン(B)から構成されるABジブロックコポリマー(糖修飾ポリスチレンブロックコポリマー)を得た。最終的にAセグメントの重合度が90、Bセグメントの重合度が2、3、6、14、32および37に制御された5種類のサンプルを得た。

糖修飾ポリスチレンブロックコポリマーに関して溶解性試験と重水、重クロロホルムおよび重ピリジンにおける<sup>1</sup>H NMR測定を行った。その結果、AおよびBセグメント両方の良溶媒であるピリジン中では会合体を与えなかった。それに対してBセグメントの貧溶媒であるトルエン、テトラヒドロフラン、およびクロロホルム中ではBおよびAセグメントをそれぞれコアおよびシェルとする高分子逆ミセルを形成することが示された。それらの直径はBセグメントの重合度や溶媒の種

類に応じて 30 ~ 260 nm の間で変化することが動的光散乱測定によりわかった。またこの高分子逆ミセル溶液をシリコンウェハーにスピンコートして得たキャストフィルムの原子間力顕微鏡 (AFM) 測定ではマイクロ相分離構造に由来すると思われる凹凸が観測された。さらに糖修飾ポリスチレンブロックコポリマーは水中では A セグメントをコアおよび B セグメントをシェルとする高分子ミセルを形成することもわかった。動的光散乱で見積もった高分子ミセルの平均粒径は 158 ~ 217 nm であった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Cristiano Giacomelli, Vanessa Schmidt, Jean-Luc Putaux, Atsushi Narumi, Toyoji Kakuchi, Redouane Borsali, "Aqueous Self-Assembly of Polystyrene Chains End-Functionalized with  $\beta$ -Cyclodextrin" *Biomacromolecules*, 10, 449-453 (2009) 査読有

Atsushi Narumi, Toyoji Kakuchi, "Synthesis of Glycoconjugated Branched Macromolecular Architectures" *Polym. J.*, 40, 383-397 (2008) 査読有

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

鳴海 敦 (NARUMI ATSUSHI)

山形大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：60443975