

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月7日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590127

研究課題名（和文） 新規徐放性医薬の開発を目的とした生理活性分子結合ポリマーの創製

研究課題名（英文） Polymers with chemically bound bioactive molecules: Synthesis and application to slow drug-delivery

研究代表者

若槻 康雄 (WAKATSUKI YASUO)

日本大学・文理学部・教授

研究者番号：20087513

研究成果の概要（和文）： 徐放性医薬はステロイドやホルモン療法において重要であり、高分子化合物のマトリックスとしての利用も行われているが、従来は生理活性化合物との物理的混合（練合せ）が殆どであり医薬分子の放出速度にムラがあるなどの問題点があった。本研究では生理活性分子やイオンを化学結合したポリマー合成とそのフィルム化を行う手法を開発し、自然環境下で長期間にわたり一定の効果をもつ生理活性ポリマーフィルムの創製をめざした。

研究成果の概要（英文）： Slow drug-delivery is an important theme in therapeutic use of steroids and hormones. Some polymer materials have been employed as a matrix but mostly by means of simple physical mixing with drugs, which often leads to unreproducible release of the medicinal molecules. In this project, we have developed new methods to prepare suitable polymers with chemically bonded pendant of bioactive molecules or ions and aimed at creation of bioactive polymer films which are constantly valid for a long period of time under ambient conditions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬分子設計・ポリマー・フィルム・ノルボルネン・開環重合・付加重合

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高分子材料を医薬徐放のためのマトリックスとして用いた報告例は多いが、その殆どは医薬分子との物理的混合体としての利用形態をとっている。特に生分解性ポリマーとの混合、ポリマーミセル中への医薬分子の包含などの検討例が多い。

(2) プラスティック製品に抗菌性を付与する研究例は多いが殆どが銀微粒子を分散させたものであり、プラスチック固体表面に一部露出した銀粒子から銀イオンが溶け出す事を期待したものである。この場合、内部に埋没した多くの銀粒子は無駄となる問題点がある。

(3) 医薬分子を化学的に結合したポリマーの合成例が2, 3知られているが、いずれもノルボルネンの開環重合を利用したものである。その結果ポリマー主鎖骨格に、取り込まれたモノマー数と同数のC-C二重結合が形成され、そのため空気酸化され易い、特に加熱下で酸化分解され易いなどの問題点を有していた。

## 2. 研究の目的

(1) ポリマー鎖にステロイド類置換体を導入する手法を確立し、生成した生理活性ポリマー固体（フィルム）からのステロイド分子の放出性を確認する。ステロイド類のポリマー結合体については報告例が無い。上記1-(3)の欠点を有するもの、まず合成容易なノルボルネンの開環重合体を基本骨格として採用し検討する。

(2) 同様にノルボルネンの開環重合体を基本骨格として用い、銀イオンを主鎖に配位させる方法論を確立し、高効率な抗菌フィルムを合成する。

(3) 上記のステロイドポリマーおよび銀イオンポリマーを、空気中での加熱殺菌可能な、より安定な形態のものへと改質する。すなわち、ノルボルネンの開環重合体でなく主鎖にC-C二重結合をもたず、かつ耐熱性に優れた付加重合体を用いる手法を開発する。

## 3. 研究の方法

(1) ポリマーに生理活性分子を結合するルートとしては、モノマーに結合して重合する方法と、別途合成したポリマーとの反応による方法がある。後者のルートを採用する場合にも、ポリマーにはあらかじめ、生理活性分子と結合できる官能基を備える必要があり、対応する官能基モノマーの重合が必要となる。これらの要件を考慮し、基本となるモノマーとしてノルボルネン誘導体を用いた。

(2) ステロイド性生理活性化合物としてエストロン、エストラジオールをはじめ水酸基もしくはカルボキシ基を持つものを選び、ノルボルネンモノマー骨格にあらかじめ導入した同様な置換基を利用してエステル結合を介して結合する。得られたステロイド結合ノルボルネンモノマーについて開環重合反応性を検討する。

(3) ピリジル基を側鎖にもつノルボルネンモノマーを合成しその開環重合反応性を検討する。ポリマーが得られた場合にはピリジン窒素への銀イオンの配位を利用して銀イオンを高分子側鎖に導入し、ポリマーフィルム状態での抗菌活性を調べる。

(4) 極性置換基もしくは極性基に誘導可能な置換基をもつノルボルネン誘導体について、有効な付加重合触媒系の開発を行う。新たな触媒系を用いて得られた付加重合体のポリマー反応によって、側鎖にカルボキシ基またはピリジル基を導入し、ステロイド類や銀イオンを結合できる高分子マトリックスを構築する。

## 4. 研究成果

(1) 7種類のステロイド誘導体とノルボルネンをエステル結合で結んだモノマーを収率良く合成できた。極めて嵩高い誘導体であるにも拘わらず、これらモノマーはルテニウム-カルベン錯体を触媒として2万から28万の分子量をもつ開環重合体とする事ができた。いずれの重合体も溶媒キャスト法によりフィルム化できる事がわかったが、特にエストロンをペンダントにもつ重合体はしなやかで強靱な透明フィルムを与えた。

(2) ステロイドを結合したモノマーおよびその重合体の溶解性は高くないので、重合反応は加熱（70℃）条件下で行う必要があった。その様な条件では通常低温～室温で高活性を示す Grubbs (2-nd generation) よりも、我々が以前合成した、安価で容易に得られる Ru(vinylidene) 錯体の方が触媒として有効であり、分子量、狭い分子量分布に優れた重合体を与える事がわかった。

(3) 貼付型ホルモン剤医薬としての利用を想定し、エストロンを結合したポリマーフィルムを人体の汗に近い条件（37℃、pH 4-6）におき、エステル結合の加水分解によるエストロン放出性を検討した。極めてゆっくりと、一定速度で放出される事が確認できた。また、放出速度が pH に依存しないため、律速段階はエステル結合の加水分解反応ではなく、加水分解されてフリーになったエストロン分子が固体フィルムの束縛（ミクロな間隙）から散逸するステップであると結論した。

(4) ピリジン環の4-位でノルボルネンに結合した誘導体はルテニウム錯体触媒で全く（開環）重合しなかったが、同様に2-位で結合したモノマーは高い重合反応性を示すことを見出した。ピリジン窒素が触媒活性中心に配位して反応を阻害する効果が2-位誘導体 (pyridin-2-yl 体) では立体的に避けられるためと思われる。分子量4-5万の重合体が好収率で得られた。

(5) 側鎖に pyridin-2-yl をもつポリマー溶液に銀イオンを計算量加えると、全ての pyridin-2-yl 基に銀を配位した高分子錯体が得られる事を NMR で確認した。この銀配位

ポリマーはフィルム化することが可能であった。

(6) 上記(5)で得られたフィルムは大腸菌および枯草菌に対して強い殺菌効果を示した。フィルム表面に存在する pyridin-2-yl に配位した銀イオンが溶液中に浸したフィルム表面から解離することによる。一定量の水溶液中で一定量の大腸菌を死滅させるに必要なフィルムの最小面積で抗菌活性を表すことができる。

(7) 側鎖に pyridin-2-yl をもつポリマー溶液に銀イオンを加えず、そのままキャストしてフィルム化を行い、このフィルムを銀イオン溶液に一定時間浸漬した後洗浄、乾燥して得たフィルムには、表面に存在するピリジル基のみに銀イオンが配位していると推測される。実際このフィルムの抗菌活性は上記(5)で得られたフィルムのそれに等しいことがわかった。

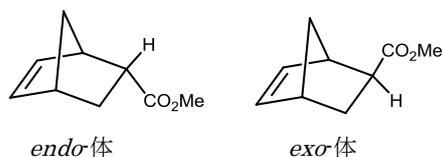
(8) 一定面積をもつ上記(7)で得た抗菌フィルムについて抗菌試験を繰り返すと、いずれ表面に配位した銀イオンが全て溶液中に解離して抗菌性を失活した。しかし再度(7)と同じ操作によって銀イオンを表面配位させると、再びフレッシュな抗菌活性を獲得し、このサイクルは何度でも繰り返す事ができた。即効性と再利用に優れた抗菌包装フィルムなどへの応用が期待できる。

(9) 以上の研究経過ではノルボルネンの開環重合体をポリマーの基本構造として採用していた。ポリマー主鎖に炭素二重結合を持たず、安定性と耐熱性により優れた付加重合体を与える新規触媒を探索した。既知の錯体ながら0価であることが盲点となって重合の学術文献例がなかった Pd(dba)<sub>2</sub> および Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> 錯体が、(CPh<sub>3</sub>)[B(C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>)<sub>4</sub>]と組み合わせる事により極めて有効な触媒となる事を見出した。ホスフィン配位子 P(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>)<sub>3</sub>を等モル加えた系ではさらに活性が向上した。

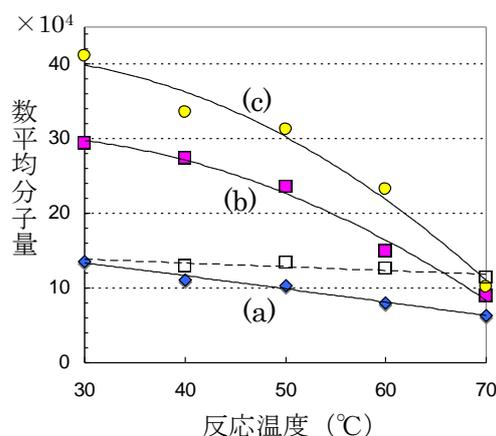
(10) ビニル基を置換基としてもつノルボルネン誘導体モノマーの重合においては、環骨格の二重結合のみで選択的に付加重合し、置換基のビニル基はそのまま側鎖として残存した高分子量のポリマーが得られた。

(11) メチルエステル基が結合したノルボルネンはシクロペンタジエンとアクリル酸メチルを混合するだけで容易に得られるが、エンド体が主生成物であることは良く知られている。既存の付加重合触媒ではエキソ異性体が重合し、得やすいエンド体の方は重合しない事が負の要因になっていた。今回見出さ

れた0価パラジウム触媒系ではエンド体の方が先に消費されるという事が明らかとなりこの問題点を解決する事ができた。



(12) 本 Pd(0)触媒系ではまた、重合温度によって生成する付加重合体の分子量が大きく変化するという、従来の重合触媒では見られなかった特徴を有する事がわかった(下図)。



モノマー/触媒比 (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000.  
破線は従来のパラジウム2価触媒を用いた場合。

余分な分子量調節剤を添加する事無く、モノマー仕込みの触媒比と重合温度を変える事で分子量の制御が可能となった。

(13) 上記(10)で示されたビニル側鎖をもつノルボルネン付加重合体の溶液に、低温でオゾンを通じると、側鎖をカルボキシ基に変換できることは、メタノールを加えてメチルエステル置換体に変換することで確認できた。これにより、水酸基をもつ生理活性化合物(例えばエストロン)をエステル結合生成によって、ノルボルネン付加重合体に導入する基本反応が確立できた。また、4-ピリジンプロパノールを反応させる事でピリジル基を側鎖にもつ付加重合体を合成できる事を確認した。これにより耐熱性、安定性に優れた銀イオン配位抗菌フィルムを合成するルートが拓けた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① T. Saito, Y. Wakatsuki, Addition polymerization of norbornene, 5-vinyl-2-norbornene and 2-methoxycarbonyl-5-norbornene with a catalyst based on a palladium(0) precursor complex, *Polymer*, 査読有、Vol.53, 2012, 308-315.
- ② K. Mitamura, N. Hori, S. Mino, T. Iida, A. F. Hofmann, S. Ikegawa, Synthesis of 3-Sulfates of *S*-Acyl Glutathione Conjugated Bile Acids and their Biotransformation by a Rat Liver Cytosolic Fraction, *Chem. Phys. Lipids*, 査読有、Vol.165, 2012, 261-269.
- ③ S. Takano, H. Tamegai, T. Ito, S. Ogawa, T. Iida, Y. Wakatsuki, *React. Funct. Polym.* 査読有、Vol. 71, 2011, 195-203.
- ④ S. Ogawa, K. Mitamura, S. Ikegawa, M. D. Krasowski, L. R. Hagey, A. F. Hofmann, T. Iida, Chemical Synthesis of the (25*R*)- and (25*S*)-Epimers of 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihydroxy-5 $\alpha$ -cholestan-27-oic Acid as well as Their Corresponding Glycine and Taurine Conjugates, *Chem. Phys. Lipids*, 査読有、Vol.164, 2011, 368-377.
- ⑤ S. Ogawa, S. Takano, H. Fujimori, T. Iida, Y. Wakatsuki, Ring-opening metathesis polymerization of steroid-conjugated norbornenes and gradual release of estrone from a polymer film, *React. Funct. Polym.* 査読有、Vol. 70, 2010, 563-571.
- ⑥ S. Ogawa, Y. Wakatsuki, M. Makino, Y. Fujimoto, K. Yasukawa, T. Kikuchi, M. Ukiya, T. Akihisa, T. Iida, Oxyfunctionalization of Unactivated C-H Bonds in Triterpenoids with *tert*-Butyl-hydroperoxide Catalyzed by Meso-5,10,15,20-tetramesitylporphyrinate Osmium(II) Carbonyl Complex, *Chem. Phys. Lipids*, 査読有、Vol.163, 2010, 165-171.

[学会発表] (計6件)

- ① 宮崎照雄, 本多彰, 池上正, 飯田隆, 松崎靖司、脂肪肝予防・治療薬としての FXR リガンドの可能性について、第 33 回胆汁酸研究会、2011 年 11 月、大阪ガーデンパレス。
- ② 手塚裕昭、若槻康雄、オリゴシロキサン含有ポリノルボルネン誘導体の合成とその物性、第 60 回高分子討論会、2011 年 9 月、岡山大学。
- ③ 斎藤竜也、庭山和樹、酒井佑輔、若槻康雄、Pd(0)錯体を用いたノルボルネンとビ

ニルノルボルネンの付加共重合、第 91 日本化学会春季年会、2011 年 3 月、神奈川大学。

- ④ 小川祥二郎、飯田隆、岡田浩章、池川繁男、三田村邦子、A. F. Hofmann、潜在的胆汁酸 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihydroxy-5 $\alpha$ -cholestan-26-oic acid エピマー体とその抱合体の化学合成、第 32 回胆汁酸研究会、2010 年 11 月、東北大学。
- ⑤ T. Saito, H. Fujimori, Y. Wakatsuki, H. Tetsuka, Addition Polymerization of Substituted Norbornenes Using Palladium(0) Complexes, 第 57 回有機金属化学討論会、2010 年 9 月、中央大学。
- ⑥ 小方聖太郎、伊藤敏宏、為我井秀行、小川祥二郎、飯田隆、若槻康雄、ビリジン-銀錯体を結合した ROMP ポリマーの合成と抗菌フィルムへの応用、第 90 日本化学会春季年会、2010 年 3 月、近畿大学。

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：ノルボルネン付加重合用パラジウム触媒並びにノルボルネン付加重合体及びその製造方法

発明者：若槻康雄

権利者：学校法人日本大学

種類：特許

番号：特願 2011-36048 号

出願年月日：23年2月22日

国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若槻 康雄 (WAKATSUKI YASUO)

日本大学・文理学部・教授

研究者番号：20087513

(2) 研究分担者

飯田 隆 (IIDA TAKASHI)

日本大学・文理学部・教授

研究者番号：60060125