

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350529

研究課題名(和文)高分子材料の血液適合性発現機構の解明と分子設計

研究課題名(英文)Understanding the expression of blood compatibility of polymeric materials

研究代表者

望月 明(Akira, Mochizuki)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：00384925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：種々のポリマーを用い、ポリマー分子/官能基の運動性、ポリマー中の水構造と水分子の運動性、血小板適合性について検討した。その結果、適合性にはポリマー/官能基の運動性と水分子の運動性が大きく関与していることを示唆する結果が得られた。ポリマー/官能基により束縛された水分子でT1緩和時間が数10～数100msの範囲の水が適合性発現に望ましいと結論した。これらの知見を基に材料の設計にあたっては、水と相互作用可能な官能基を有すること、官能基の運動性が高い(Tgが低いあるいは当該官能基がポリマー主鎖骨格より遠位に存在)こと、数%程度以上の含水率を有するポリマーであること、を満たす必要があると結論した。

研究成果の概要(英文)：There are many reports about the blood compatibility of biomaterials until now. However, the reason for expressing the good performance is not fully understood. To understand the mechanism, we investigated the relationships among platelet compatibility, water structure and mobilities of the functional groups, the water molecules in the polymers and polymer molecule itself using DSC, WAX, and NMR, where the polymers used are HEMA-based block/random-copolymers and polyether-poly(methyl methacrylate) block copolymer. These investigations show that the important factors determining the compatibility are the higher mobility functional groups that can interact with water molecules and the water molecules with the lower mobility than that of bulk water. It is estimated that the good performance is obtained when the mobility of the water molecules in the polymer are depressed to several 10 ms of 2H-T1 (D20 by NMR).

研究分野：血液適合性

キーワード：血液適合性 生体材料 水の構造

1. 研究開始当初の背景

医用材料の研究・開発において、血液適合性の研究は最も重点的になされているが、いまだ未解明といっても過言でない。例えば自己組織化膜表面は化学構造が確定している事から官能基と血液成分の関係が明確化できると期待されたが、現状では、あい矛盾する結果が多数報告されている。この事は、表面官能基は必ずしも直接血液成分に影響せず両者の間に何か介在する事を暗示している。血液が材料に接触すると真っ先に材料に接触する分子は水であることから、材料における水の構造が重要な役割を果たしているという提案がある。しかし適合性発現に必要な水の構成要件としては、自由水が多量にある事や、弱く束縛された水が存在する事などが定性的に主張されている程度であり、本研究が目指す、『熱的、運動論的に水の構造を特定し、これに対し血液適合性やタンパク吸着との相関性を定量的に議論しよう』としたものはない。

2. 研究の目的

本研究は、血液適合性発現の機構を材料中の水の構造からを解明しようとするものである。具体的には 適合性発現に關与する水の構造を具体的に特定し、それが血液適合性発現の普遍的要因である事を証明すること、この水の構造を与える高分子構造を特定し、医用材料の分子設計に指針を与えること、今後その種類が増すと考えられる埋め込み型医療器において問題となる、免疫系に対する適合性について、この水構造の知見の有効性を確認すること、を目的とするものである。その手法としていくつかの高分子を合成し、高分子の化学構造/表面特性/運動性、水の構造、生体適合性の三者の関係について、種々の分析手法を組み合わせ用い検証する事で本目標を達成する。

3. 研究の方法

1) 初年度(26 年度): HEMA 系ブロック及びランダム共重合体について

ブチルメタクリレート(BMA)-HEMA ブロック共重合体と対照としてのランダム共重合体を合成する。これらポリマー試料について XRD(X 線回折装置)、DSC(示差走査型熱量計)等を用い束縛水の質的、量的な違いについて解析し、ブロック化の意義を検証する。そしてこれまで蓄積しつつある MMA, EMA 系共重合体の結果と比較検討する。

2) 次年度(27 年度): ポリプロピレングリコール (PPG) を 1 構成成分とする共重合体

分子量の異なるポリプロピレングリコール(PPG)末端に ATRP 開始点を導入したポリマー型開始剤を合成し、メチルメタクリレート(MMA) との AB 型ブロック共重合体を各種合成する。PPG 鎖長の表面特性、水の構造、血液適合性への影響を調べる。

3) 最終年度(28 年度): ポリアルキレングリコール (PE) 系の共重合体

前年度に引き続き PPG 系共重合体に加え、PE としてポリテトラメチレングリコール (PTMG) 系の共重合体も合成し、PE セグメント長、PE 種が血液適合性、表面特性、ポリマーの運動性、束縛水を中心とした水の構造へ及ぼす影響を調べる。HEMA 系共重合体から得られた知見を加え、水の構造と血液適合性の相関を調べ、水の構造(束縛水)が血液適合性に影響することを明確にし、同時にこの水構造を与える材料側因子を特定し材料の設計指針を提案する。

4. 研究成果

[] HEMA 系共重合体

(1) HEMA-MMA ブロックポリマー

MMA-HEMA, EMA-HEMA 二元ブロック共重合体の含水構造を考察する過程で、その含水量は HEMA 含量に依存することから、水分子は HEMA ユニット近傍に存在すると結論した。従って水の構造(不凍水量、凍結水量)も HEMA 含量に依存すると予想されたが、実際は HEMA 含量から推定される構造に対し、不凍水量はより過剰に逆に凍結水量は大きく減少した構造を観察するに至った (Fig.1)。そしてこの過剰分の不凍水分子(不凍水 II と命名)により血小板適合性がもたらされると結論した (Fig.2)

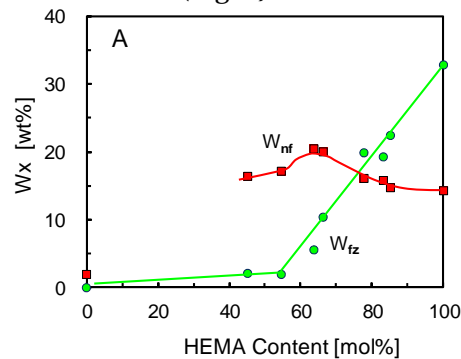


Fig.1 MMA-HEMA ブロック共重合体中の水の構造

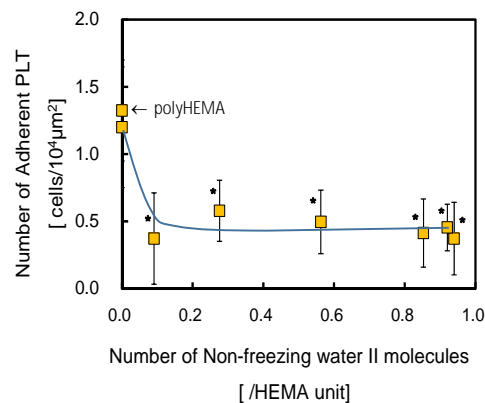


Fig.2 不凍水II分子数と血小板粘着

一方、固体の NMR 観察からこの不凍水 II の形成には PMMA 部のエステル基の運動性が低下(=T₁ 緩和時間の延長)するに伴い、不凍水分子 II 数の増大が認められた (Fig.3)。

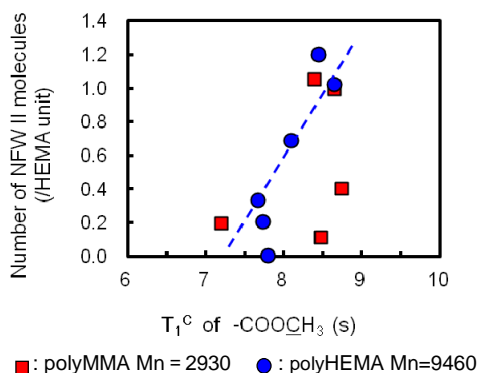


Fig.3 メチルエステル基の運動性と不凍水 II 分子数

更にポリマー分子全体の運動性に対応する緩和時間 $H-T1\rho$ からその運動性の低下に伴い不凍水 II が増加する傾向を見出した。この原因は PHEMA 鎖と PMMA 鎖との相互作用と推定される。又、MMA-HEMA、エチルメタクリレート(EMA)-HEMA 共重合体ともにある組成で低温結晶化する水(中間水)の存在を XRD-DSC から確認できた。

次にこの延長としてエステル炭素鎖長が MMA、EMA より更に伸びた BMA を用いた HEMA との 2 元ブロック及びランダム共重合体について、その詳細を以下に述べる。

(2) HEMA-BMA 系ポリマー

1) ポリマー

使用したブロック共重合体の同定結果を Table.1 に示す。

Table.1 BMA - HEMA ブロックポリマーの同定結果

Polymer	Obsd Compo ¹⁾ (HEMA/BMA)	Total Mn NMR	Mn GPC	HEMA Segment Mn ²⁾	Mw/Mn ³⁾
PHEMA	100/0	-	189100	189100	2.51
	84/16	17800	21500	14700	1.14
	76/24	12600	11800	9300	1.13
	58/42	18600	14600	10400	1.16
HEMA-BMA	41/59	27600	13800	10700	1.13
	33/67	24800	18900	7700	1.20
	26/74	27400	17100	5100	1.12
	19/81	19400	19100	3400	1.78
PBMA	9/91	25900	22000	2200	1.48
	0/100	30000	14000	0	1.32

¹⁾mol%/mol%²⁾¹H-NMR ³⁾GPC

又、ATRP 法で合成したランダム共重合体は分子量が 1 万前後のものである。

2) 表面構造

水滴の接触角の観点から各共重合体の表面構造の HEMA 含量依存性を調べた。ブロック共重合体では HEMA 含量 60% を境に表面偏析するセグメントの種類が変わることが示唆された。ランダム共重合体ではおおむね HEMA 含量の影響を受け、HEMA/BMA ユニットがポリマー組成に近い状態で存在していることが示唆された。したがって両共重合体では表面組成が異なると推定される。

3) 共重合体中の水の構造解析

飽和含水試料中の水の構造(含水量(EWC)、凍結水量(Wfz)、不凍水量(Wnf))について述べる。EWC は、先の MMA、EMA 系ブロック

共重合体同様、両共重合体ともに HEMA 含量の増加に伴い単調に増加し、さらにランダム、ブロックの両ポリマーともその EWC は同じ線上に乗っていた(Data not shown)。これより、ポリマー中の水分子は共重合体の構造に関係なく HEMA ユニットに強く支配、即ちその近傍に存在していることが示唆される。一方、Wfz、Wnf については両ポリマーとも同じ曲線或いは直線に乗ることが分かった。Wnf についてのみ Fig.5 に示すがこれより HEMA ユニット近傍の水分子の状態が両共重合体間ではほぼ同じ状態にある事が分かる。この図は Fig.1 に示した MMA-HEMA ブロック共重合体の Wnf の挙動と大きく異なり、更に DSC-XRD 分析でも

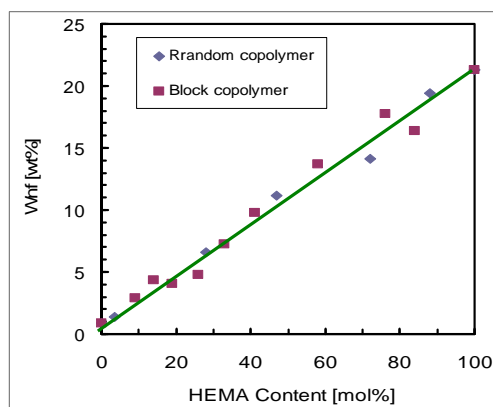


Fig.4 Wnf の HEMA 含量依存性

低温結晶化する水(中間水)の存在は確認できなかったことから水の構造は MMA-HEMA および EMA-HEMA ブロック共重合体のそれとは大きく異なるといえる。

4) ブロック共重合体の適合性比較

ブロック及びランダムポリマーの血小板適合性の比較結果を Fig.5 に示す。

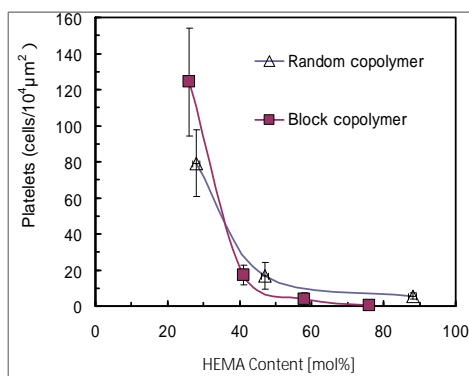


Fig.5 ランダム/ブロック共重合体の血小板適合性比較
Mean \pm SE (n=4)

この図において血小板粘着数は、HEMA 含量が低い領域(30%)ではランダムポリマーの方が少ないのに対し、高い領域(>40%)ではブ

ブロックポリマーの方が少ない傾向にある。これはブロック共重合体では wet 環境での表面構造変化(表面偏析セグメントが PBMA から PHEMA に代わる)によるものと考えられる。一方ランダムポリマーの血小板粘着数は HEMA 含量に依存していると考えられる。しかし、両ポリマーとも適合性は HEMA ホモポリマーに勝ることはなく、MMA 系或いは EMA 系のブロック共重合体とは異なる適合性の結果となった。この結果は MMA 系或いは EMA 系のブロック共重合体の適合性発現には不凍水 II 或いは中間水が関与していることという考えを支持すると考えられる。

[] PPG-PMMA ジブロック共重合体

1)ポリマー

PPG 開始剤及び合成したポリマーの同定結果を Table.2 に示す。尚、CM-polyMMA (CM-PMMA)は市販 PMMA、Pn(PG)は PPG における PG ユニットの繰り返し数である。

Table.2 開始剤及び PPG-PMMA の同定結果

Original PPG Pn(PG) ^a	PPG initiator		Composition ^d PG/MMA (mol/mol)	PPG-polyMMA			
	Mn NMR ^b	Mn GPC ^c		Mn by NMR		GPC ^c	
				polyMMA part	Total Mnr	Mn	Mw/Mn
94 (Mn = 5526)	5675	5680	30.9/69.1	21000	26700	9000	1.23
20 (Mn = 1234)	1384	2030	25.1/74.9	5900	7300	8000	1.11
6 (Mn = 422)	572	640	5.1/94.9	11200	11800	8800	1.09
3 (Mn = 248)	398	390	3.1/96.9	7800	8200	9600	1.12
1 (Mn = 132)	282	—	1.0/99.0	9460	9700	10000	1.09
CM-polyMMA	—	—	0/100	—	—	32400	2.42

2)PPG-PMMA の表面解析

XPS、表面接触角の観点から PPG-PMMA の表面構造を解析した。XPS の分析深さ(10nm 以下)においては明確な 1 成分の表面偏析は確認できなかった。乾燥表面に対する水接触角、水中における表面に対する気泡接触角から PPG-PMMA の表面構造考察したところ PPG セグメントで覆われていることが示唆された。(Data not shown)

3)血小板適合性

PPG-PMMA 表面に粘着した血小板数とこのポリマーに接触させた血小板に対しフローサイトメトリー(FC)を用いた活性化レベル観察の観点から、適合性を検討した。ここでは粘着数の結果のみを Fig.6 に示す。

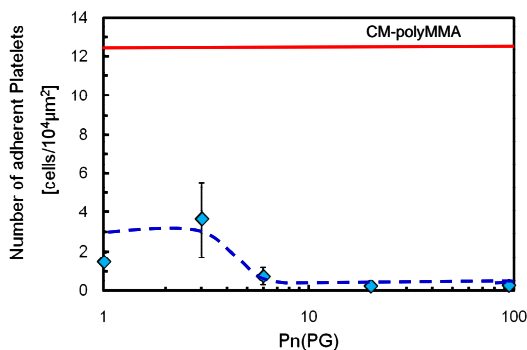


Fig.6 PPG-PMMA 表面に粘着した血小板数

両方法において PPG-PMMA の活性化挙動(Pn(PG) 値依存性)は類似の傾向を示し Pn(PG) 値の増加は血小板の活性化を CM-PMMA に比べ大幅に抑制し、特にその値が 20 を超えると顕著になる。Pn(PG)値が 1 の PPG-PMMA においても血小板の活性化レベルは CM-PMMA より有意に低く、末端基となる PG ユニットのエーテル基が適合性関与に関与していることを示唆している。

4)PPG-PMMA の蛋白吸着挙動

これまで血小板適合性についてはフィブリノーゲンやアルブミンが注目され、その吸着量やそのコンホメーション変化の関与が指摘されている。そこでこれら 2 つの蛋白質につき吸着特性を考察した結果を Fig.7 に示す。

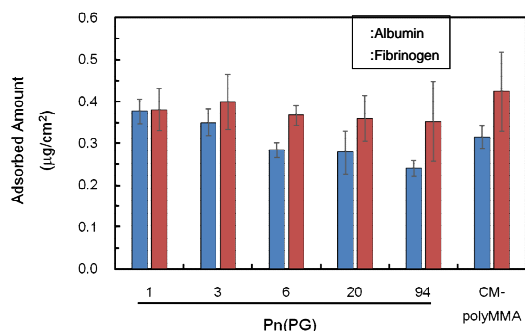


Fig.7 PPG-PMMA の蛋白質吸着特性

アルブミンを見ると Pn(PG)値の増大に伴い吸着量は減少し、Pn(PG) = 94 の時、最少となった。この時有意差は Pn(PG)=94 vs CM-PMMA 以外は認められなかった。次にフィブリノーゲンの吸着量について見ると全てのポリマーにおいて同一レベルで有意差を認めなかった。更にフィブリノーゲンのコンホメーション変化(鎖の露出)レベルについて検証したが、露出レベルは低くポリマー間で傾向は認められなかった。従って今回のポリマーにおいては吸着したアルブミン/フィブリノーゲンは血小板適合性に殆ど関与していないことが示唆された。

5)PPG-PMMA 中の水の構造

本研究の発端となった PMEAA の適合性発現と中間水の存在の観点から、PPG-PMMA 中の水の構造について検証した。まず初めに PPG 開始剤および CM-PMMA 中の水の構造について述べる。EWC は PPG 開始剤で 4 wt%以下、CM-PMMA では 2 wt% 程度で、DSC からこれらの水は不凍水として存在していることが確認された。これらの知見から PPG-PMMA 中の水はすべて不凍水として存在すると予想されるが、実際は異なっていた。PPG-PMMA 中の水の構造を Fig.8 に示す。即ち PPG-PMMA は比較的高い EWC を示し(5.6–7.8wt%)、不凍水(Wnf = 3.5–5.4 wt%)

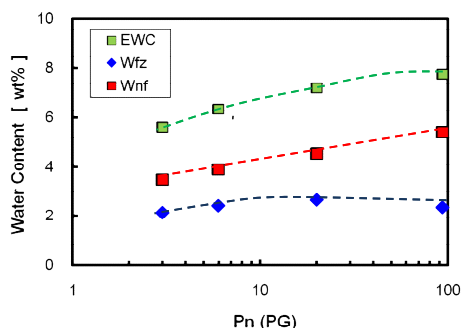


Fig.8 PPG-PMMA の水の構造

に加え、Pn(PG)値に依存せずほぼ一定量の凍結水(Wfz = 2.1–2.7 wt%)を認めた。従ってこの凍結水は PPG 鎖と PMMA 鎖の協力により形成されたと考えられる。この熱分析に基づく水構造の定義上、凍結水は自由水と弱束縛水を含んでいる。一方、PMEA 中の中間水は束縛水の種類であることを考えると、PPG-PMMA の適合性発現にはそのポリマー中の束縛水が関与しているとも考えられる。

6)官能基の運動性と適合性

先の 3)で述べたように Pn(PG)値が 1 である PPG-PMMA、即ち末端に PG のエーテル基が 1 つだけ入った PMMA においても血小板適合性の顕著な改善が認められたことを受け、初期計画外ではあるがメトキシエチルエステル基及びメチルエステル基を有するポリマーを合成し、官能基の運動性、水の構造、血小板適合性の三者の関係を調べ、官能基が早い運動性を有する場合には適合性が向上し、このとき凍結性の水が形成されていることを認めた。(Data not shown)

【 】PMMA-PAG-PMMAトリブロック共重合体 PPG 及び PTMG を用い A-B-A 型のトリブロック共重合体を合成、先の PPG-PMMA ジブロック共重合体と比較検討した。

1)ポリマー

Table.3 に使用したポリマーの特性を示す。

Table. 3 PE 系ブロックポリマーの同定結果

Abbrev.	PE(initiator)		Block copolymer				
	n ¹⁾	Mn	PMMA segment (NMR)			GPC(Total MW)	
			m ¹⁾	Mn	Total Mr	Mn	Mw/Mn
Di-block	20	1390	61	6100	7490	8000	1.11
	94	5680	210	21000	26680	9000	1.23
PPG	44	2870	57	5700	14270	10800	1.17
	12	1020	29	2900	8670	7700	1.17
			44	4400	9820	13000	1.10
21	2100	5220	6600	1.17			
Tri-block	2	431.8	-	-	-	9049	1.18
	-	-	-	-	-	4981	1.14
PTMG	31	2550	54	5400	13350	11600	1.18
	20	2000	6050	8200	1.31		
	46	4600	10450	12800	1.16		
13	1250	22	2200	5650	7000	1.19	
CM-PMMA	市販 PMMA	-	-	-	-	32400	2.42

2)血小板適合性

血小板適合性の結果を Fig.9 に示す。各コポリマーの粘着数は CM-PMMA(粘着数 45 個)に比べるといずれも大幅に減少しており適合性の顕著な改善が認められた。これは

PE 鎖によってもたされると判断される。次に各コポリマー間を比べると、PPG-PMMA ジブロックは PMMA-PPG-PMMA トリブロックより優れ、更に PPG 系トリブロックは PTMG 系トリブロックより適合性に優れる傾向にある。

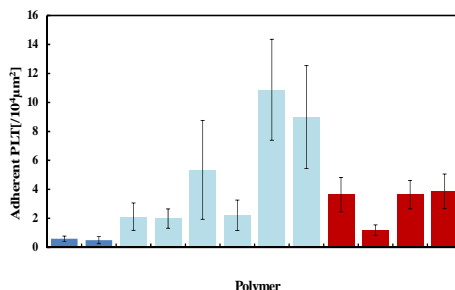


Fig.9 各共重合体の血小板適合性 (mean±SE, N=5, CM-PMMA=45[/10⁴μm²])

3)XPS 及び接触角からの表面解析

各ポリマーに対し、SPX、表面接触角(水滴法及び気泡法)からその表面構造を解析した。これらの結果から各セグメントの長さに影響はされるものの全般としては表面には PE 鎖が露出していることが示唆された。

3)分子運動性

まずモデルケースとして含水 PE 開始剤を用い各種分子運動性を検討した。開始剤中の水(D₂O)の緩和時間 T₁ は Fig.10 のように PE 鎖長の増大に伴い短くなる(30 10 ms)が、バルク水(D₂O)の T₁(570ms)と比較すると大きくその運動性が低下していることがわかる。一方、PE 開始剤の運動性は分子量の増大とともに低下することから(data not shown)、水分子の運動性は PE の運動性によって支配されていることが推定される。

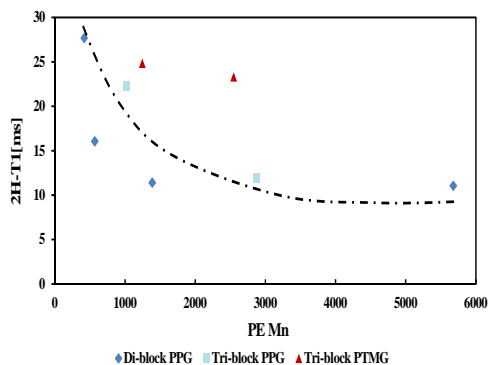


Fig.10 開始剤中の重水の T₁ 緩和時間 (含水率:0.5%)

次にブロックポリマーの運動性を見ると PE 鎖についてはポリマー間で差を認めず一定であった。一方、PMMA 鎖についてカルボニル炭素緩和時間から見ると、CM-PMMA に比べいずれのブロックポリマーでも T₁ は短く、運動性の抑制が確認された。更にジブロックポリマーの方がトリブロックポリマー

ーに比べ強く抑制されていた。これらのことからブロック化により PE 鎖と PMMA 鎖間で相互作用が発生することが推察される。

4) 血小板適合性と水分子運動性

Fig.11 に血小板適合性と水の運動性の関係を示す。この図は開始剤単独で使ったものであるが運動性が低い水ほど血小板適合性をもたらすことを示唆している。

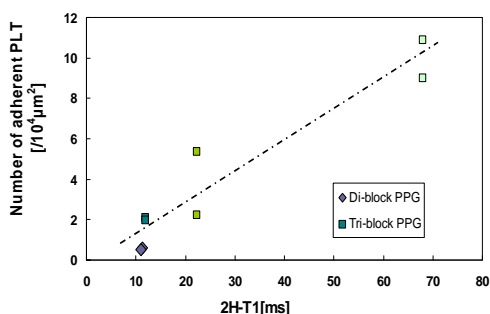


Fig.11 D₂O 緩和時間と血小板粘着の関係

【 3 年間の研究成果まとめ

種々のポリマーを用い、官能基及びポリマー分子の運動性、ポリマー中の水の構造とその運動性、血小板適合性について検討した。その結果から適合性にはポリマー及び水分子の運動性の関与が強く示唆された。従って材料の設計指針としては 水と相互作用可能な官能基を有し、官能基の運動性が高い(低 T_g: 例えば PE)こと、数%程度以上の凍結水を有するポリマーであることが必須条件であると結論した。水の観点からは 37 °C 以下でポリマー/官能基によりある範囲で束縛された水分子の存在が重要で、その T₁ 緩和時間で数 10 ~ 数 100ms の範囲にある水が望ましいと推定される。尚、適合性発現機構を水の熱的性質に基づく分類から説明することは必ずしも適切ではなく、水分子の動的状態から考えることが重要である。

今回、蛋白吸着挙動、免疫系関わる白血球系細胞に対する適合性も検討したが、検証したポリマーにおいては明確な関係を見出すには至らなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. A Mochizuki, Y Miwa, R Miyoshi, T Namiki. : Relationship between water structure and properties of poly(methyl methacrylate)-*b*-2-hydroxyethyl methacrylate) by solid-state NMR. J Biomed Mater Sci, Poly Ed. 2017, on line published, <http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2017.1310647>

2. C Fukuda, C Yahata, T Watanabe, T Kinoshita, H Tsukamoto, A Mochizuki. : Effect of end segment on physicochemical

properties and platelet compatibility of poly(propylene glycol)-initiated poly(methyl methacrylate). J Biomed Mater Sci, Poly Ed. 2017, on line published, <http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2017.1335938>

〔学会発表〕(計 7 件)

1)奥田知照、望月明：ポリプロピレングリコール系ブロック共重合体の分子運動性と血液適合性について：第 66 回高分子学会年次大会（高分子学会）(2017 年 5 月)

2)奥田知照、望月明：ポリエーテル鎖を一成分とするブロック共重合体の血液適合性について：第 65 回高分子学会討論会(高分子学会)(2016 年 9 月)

3)奥田知照、望月明：ポリエーテル (PE)系ブロック共重合体の PE 運動性と血液適合性について：第 65 回高分子学会年次大会(高分子学会)(2016 年 5 月)

4)小野大、望月明：メタクリレート構造を持つポリマーにおける側鎖及び末端基の血液適合性に対する影響について：第 65 回高分子学会年次大会(高分子学会)(2016 年 5 月)

5)樹下 拓也、八幡 千枝、望月明：ポリマー中のエステル構造の違いが血液適合性に及ぼす影響について：第 96 回日本化学会春季大会(日本化学会)(2016 年 3 月)

6) 奥田知照、望月明：PMMA-PE-PMMA トリブロック共重合体の水の構造と血液適合性：第 27 回 SAS シンポジウム(Society of Advanced Science)(2015 年 11 月)

7)大塚未来、望月明：HEMA-BMA ブロック共重合体における血液適合性の考察：第 26 回 SAS シンポジウム(Society of Advanced Science) (2014 年 11 月)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

望月 明 (MOCHIZUKI AKIRA)

東海大学 工学部 教授

研究者番号：00384925

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

田中 賢 (TANAKA MASARU)

九州大学 先端物質化学研究所 教授

研究者番号：00322850

(4)研究協力者

なし