

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350550

研究課題名(和文)糖鎖RAFT試薬活用ミニエマルジョン重合による抗血栓性ポリマーコート剤の創製

研究課題名(英文)RAFT Miniemulsion Polymerization using Oligosaccharide-Conjugated CTA Producing Antithrombogenic Polymeric Coating Agent

研究代表者

鳴海 敦(Narumi, Atsushi)

山形大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：60443975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗血栓性を材料表面に付与するポリマーコート剤を開発する研究を行った。その素材として、植物由来のオリゴ糖鎖を親水部として末端に有するビニルポリマー、すなわち糖鎖末端ポリマーに注目した。当該基盤研究では、糖鎖末端ポリマーを水中での精密重合により合成する手法を開発した。また、糖鎖末端ポリマーによるフィルム作製およびタンパク質吸着試験を行い、本素材が抗血栓性を示すポリマーコート剤として有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We have conducted this research to develop polymer coating agents constructing material surfaces showing antithrombogenicity. As a raw material for such polymeric agents, we have focused on the use of end-functionalized vinyl polymers with plant-derived oligosaccharides. A method to prepare end-glycosylated polymers with well-defined structures in water has been developed in this study. Film-formation experiments by casting the solution of the end-glycosylated polymers on the silicone substrate and protein adhesion tests on the film-surface were demonstrated, suggesting that the polymer synthesized in this study has a potential as being applicable to polymeric agents providing material surfaces showing antithrombogenicity.

研究分野：高分子化学

キーワード：糖鎖修飾CTA RAFT重合 ミニエマルジョン重合 グリコポリマー ブロックコポリマー ポリマー微粒子 植物資源高度活用 生体適合性

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物やヒトに由来する素材の医療分野での活用が規制され、生体適合性、特に抗血栓性を示す合成材料の開発が望まれていた。  
 (2) 抗血栓性材料としてはヘパリン固定化材料が用いられている。それらは主に 1980 年代に開発されたが、それ以前に、ポリマーによる親疎水性のミクロ相分離構造が抗血栓性を発現するという結果が報告されていた。  
 (3) 研究代表者は、研究開始当初、糖鎖末端ポリマーの精密合成と活用について、以下の成果を得ていた。安定ニトロキシドを介した制御ラジカル重合 (NMP) により糖鎖末端ポリマーを合成した。このポリマーは有機溶媒中で高分子逆ミセルを形成し、これをキャストして得られたフィルムは親疎水性ミクロ相分離構造を与えた。フィルムについて *in vitro* 抗血栓性評価試験を行ったところ、血栓形成時間の遅延が認められた。  
 (4) 上記より、抗血栓性を示す合成材料として、糖鎖末端ポリマーが有用であることが支持された。しかし、明確な構造を有する糖鎖末端ポリマーを合成するには、糖鎖 NMP 開始剤の合成 (5段階の有機合成反応を含む)、重合、再沈殿によるポリマー精製、さらに糖鎖部位の水酸基の脱保護を実施する必要があった。また重合活性部位の毒性を懸念する指摘もあった。

2. 研究の目的

(1) 抗血栓性を示す親疎水性のミクロ相分離構造を構築するポリマーコート剤を開発する。その素材として、究極の生体適合性分子であり、人獣共通の未知感染症に罹患する恐れのない植物由来の「糖鎖」を活用する。  
 (2) 糖鎖を親水部として末端に有するポリマー、すなわち糖鎖末端ポリマーを合成する。この際、水系不均一精密重合法、特に、制御ラジカル重合のひとつである「可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合」を「ミニエマルジョン重合」に適応した「RAFT ミニエマルジョン重合法」による合成ルートを開発する。

3. 研究の方法

(1) 有機・高分子化合物の合成実験を主とした研究を行った。機能性ビルディングブロックとして有用な糖鎖アミン誘導体の新規な合成ルートの探索と実証を行った。次に糖鎖アミン誘導体と活性エステルとのアミド化反応により、糖鎖 RAFT 試薬を合成した。糖鎖末端ポリマーの精密合成法として、まず、糖鎖 RAFT 試薬を用いたビニルモノマーの有機溶媒中での重合について検討した。続いて、水系不均一精密重合法である RAFT ミニエマルジョン重合による糖鎖末端ポリマーの合成について検討し、重合条件の最適化を行った。高分子逆ミセル溶液を調整し、それをキャストするにより親疎水性ミクロ相分離構造を有するフィルムを作製した。フィルム表面へのタンパク質吸着実験を実施した。

4. 研究成果

(1) 糖鎖アミン誘導体の合成：図 1 に合成ルートを示す。マルトペンタオース (Mal<sub>5</sub>) への 5-アジドペンチルアミンの *N*-グリコシル化反応およびそれに続く無水酢酸による *N*-アセチル化処理により糖鎖アジド誘導体 (Mal<sub>5</sub>-N<sub>3</sub>) を得た。Mal<sub>5</sub>-N<sub>3</sub> への水素添加反応により糖鎖アミン誘導体 (Mal<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub>) を得た。

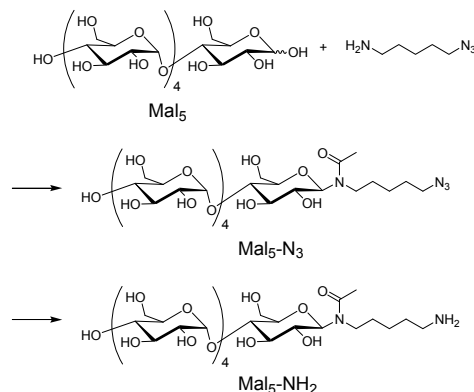


図 1. 糖鎖アミン誘導体の合成

(2) 糖鎖 RAFT 試薬の合成：図 2 に合成ルートを示す。Mal<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub> と活性エステル基を有するジチオンベンゾエート誘導体を反応し、糖鎖 RAFT 試薬 **1a** を得た。同様に、Mal<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub> とトリチオカーボネート誘導体を反応し、糖鎖 RAFT 試薬 **1b** を得た。**1** の同定は、NMR、IR、および MS 測定により行った。

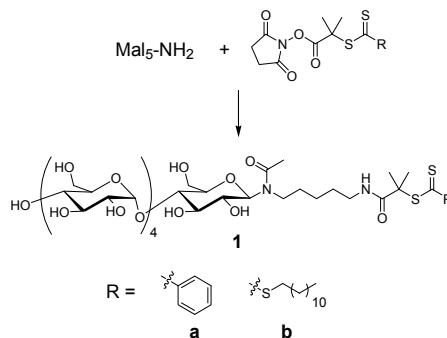


図 2. 糖鎖 RAFT 試薬の合成

(3) 糖鎖 RAFT 試薬を用いたビニルモノマーの有機溶媒中での重合：図 3 に重合のスキームを示す。スチレン (St, X = Ph) およびメチルメタクリレート (MMA, X = COOCH<sub>3</sub>) の RAFT 重合について検討した。重合は、連鎖移動剤に **1**、開始剤にアゾビスイソブチロニトリル (AIBN)、溶媒に *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) を用いて行った。一例として、St の **1b** を用いた RAFT 重合 ([St]/[**1b**]/[AIBN] = 50/1/0.5) について述べる。重合溶液を凍結脱気して封管した後、65°C で 24 時間攪拌した。GC 測定で見積もった St の転化率は 96% であった。分取 SEC により、生成したポリマーを得た。SEC 測定で見積もった生成ポリマーの数平均分子量 (*M<sub>n</sub>*) および分子量分散度

( $M_w/M_n$ ) はそれぞれ 4890 および 1.24 であった。 $M_n$  の計算値との比較や、 $^1\text{H NMR}$  スペクトル測定の結果などから、本水系重合により構造の制御された糖鎖末端ポリマーが得られることを明らかとした。主鎖重合度の異なる一連の糖鎖末端ポリマーを合成し、それらの固体における SAXS 測定を実施した。主鎖重合度が 50 の糖鎖末端ポリスチレンは、加温により、体心立方格子型の超微細相分離構造を自己構築することを明らかとした。より詳細には、糖鎖で構成された球状ドメインの直径は約 5 nm、そのドメイン間距離は約 10 nm であることが示された。糖鎖末端ポリメチルメタクリレートについても類似の結果が得られた。次世代のブロックコポリマーリソグラフィの素材としての応用展開が期待できる。

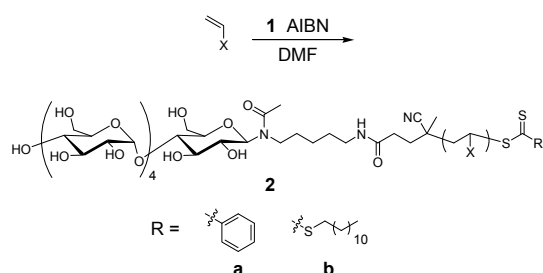


図 3. 有機溶媒中での RAFT 重合による糖鎖末端ポリマーの精密合成

(4) 糖鎖 RAFT 試薬を用いたビニルモノマーの水中のミニエマルジョン重合：  
 ①糖鎖 RAFT 試薬のミセル形成能：**1b** は分子内に糖鎖と長鎖アルキル基を持つ両親媒性化合物であり、会合体形成能の発現が予測された。そこで、ピレンを用いた蛍光スペクトル測定により、**1b** の会合体形成能を調べた。異なる濃度の **1b** の水溶液を調整し、これにピレンを加え、蛍光スペクトル測定を行った (励起波長 334 nm)。372-374 nm および 382-384 nm に観測されたピークの強度を求め、それぞれ  $I_1$  および  $I_3$  とした。それらの強度比 ( $I_1/I_3$ ) を求め、濃度に対してプロットした。プロットに屈曲点がみられたことから **1b** はミセル形成能を有することが示された。また、その屈曲点を与えた濃度である 0.46 mM を **1b** の臨界ミセル濃度 (CMC) と決定した。  
 ②RAFT ミニエマルジョン重合：St の糖鎖 RAFT 試薬 **1** を用いたミニエマルジョン重合について検討した (図 4)。実験操作を述べる。St、**1**、過硫酸カリウム (KPS)、および水を磁石攪拌子の入ったアンプル管に加えた ( $[\text{St}]/[\mathbf{1}]/[\text{KPS}] = 50/1/0.5$ ,  $[\text{St}] = 0.96 \text{ mol L}^{-1}$ )。乳化水溶液に、さらにヒドロホープとしてヘキサデカンを加え ( $0.02 \text{ mol L}^{-1}$ )、10 分間超音波処理を行った。得られたミニエマルジョン重合水溶液を凍結脱気後、封管した。水溶液を  $65^\circ\text{C}$  で 6 時間攪拌し、ポリマー微粒子の分散水溶液を得た。 $^1\text{H NMR}$  スペクトル測定で見積もった St の転化率は 92.8 % であっ

た。分散水溶液を  $1.0 \text{ g L}^{-1}$  に希釈したサンプルを調製し、走査型電子顕微鏡 (SEM) 測定を行った。図 5 に SEM 像を示す。本 RAFT ミニエマルジョン重合により、平均直径 40 nm の粒径分布の狭いポリマー微粒子が得られることがわかった。

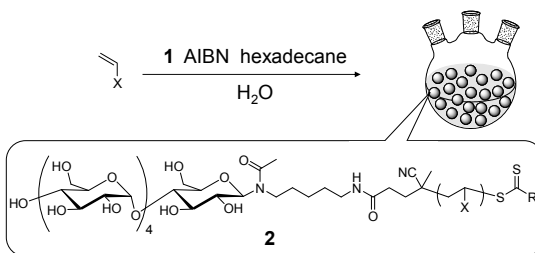


図 4. 水中での RAFT ミニエマルジョン重合による糖鎖末端ポリマーの精密合成

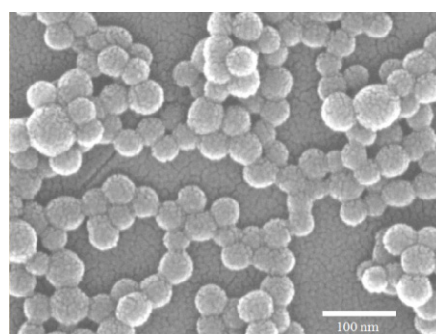


図 5. RAFT ミニエマルジョン重合で得た糖鎖末端ポリマーからなるポリマー微粒子の SEM 像

次にポリマー微粒子の構成単位であるポリマー 1 分子のキャラクタリゼーションを行った。本 RAFT ミニエマルジョン重合で得られたポリマーの SEC で見積もった数平均分子量 ( $M_n$ ) は 6500 であった (直鎖ポリスチレン換算)。これは、転化率から計算した理論値に近い値であった。 $M_w/M_n$  は 1.18 であった。以上より、本 RAFT ミニエマルジョン重合は、構造の制御された糖鎖末端ポリマーを水中で合成する手法であることが実証された。

(5) タンパク質吸着試験：RAFT ミニエマルジョン重合で得た糖鎖末端ポリマーの THF 溶液 (0.1 wt%) を調製し、これを、スピンコーターを用いてシリコン基板上にキャストし、フィルムを作製した。フィルムに対してウシ血清アルブミン (BSA) の PBS 緩衝水溶液を滴下し、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間静置した。その後、余剰の溶液を除き、PBS 緩衝水溶液で洗浄した。1.0% グルタルアルデヒド溶液に浸した後、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間静置した。洗浄後乾燥し、SEM による直接観察を行った。比較のため、ポリスチレン標準サンプル ( $M_n = 5970$ ) を用いて同様の試験を行った。ポリスチレン標準サンプルを用いて比較のために作製したフィルム上には、BSA の凝集物の形成が観

測された。それに対し、糖鎖末端ポリマーで作製したフィルム上には BSA 凝集物はほとんど観測されなかった。したがって、後者には生体適合性が付与されたこと、すなわち、抗血栓性を示す合成材料として、糖鎖 RAFT 試薬活用ミニエマルジョン重合で合成した糖鎖末端ポリマーが有用であることが支持された。動的接触測定装置による水の接触角測定を行った。糖鎖末端ポリマーで作製したフィルムの接触角は 74.8° であり、フィルム表面には糖鎖由来の親水性が付与されていることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- ① Daichi Togashi, Issei Otsuka, Redouane Borsali, Atsushi Narumi, Seigou Kawaguchi “Synthesis of Maltopentaose-Conjugated Surface-Active Styrenic Monomers and Their Micellar Homopolymerization in Water” *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 査読有り, 53, 1671-1679 (2015)
- ② Daichi Togashi, Issei Otsuka, Redouane Borsali, Seigou Kawaguchi, Atsushi Narumi “Maltopentaose-Conjugated Thermoresponsive Block Copolymer: Precision Synthesis through RAFT Polymerization of *N,N*-Diethylacrylamide” *Chem. Lett.*, 査読有り, 44, 428-430 (2015)
- ③ Daichi Togashi, Issei Otsuka, Redouane Borsali, Koichi Takeda, Kazushi Enomoto, Seigou Kawaguchi, Atsushi Narumi “Maltopentaose-Conjugated CTA for RAFT Polymerization Generating Nanostructured Bioresource-Block Copolymer” *Biomacromolecules*, 査読有り 15, 4509-4519 (2014)

〔学会発表〕(計 8 件)

- ① 小坂祥章、富樫大地、菊地守也、鳴海敦、川口正剛「RAFT ミニエマルジョン重合による糖鎖複合ブロックコポリマーの合成」第 64 回高分子討論会、2015 年 9 月 15 日～17 日、東北大学川内キャンパス(仙台)
- ② 篠原考輔、富樫大地、大塚一世、Redouane Borsali、矢野重信、鳴海敦、川口正剛「オリゴ糖鎖複合ポリ(*N,N*-ジエチルアクリルアミド)の精密合成と温度応答性ナノ構造化」第 64 回高分子学会年次大会、2015 年 5 月 27 日～29 日、札幌コンベンションセンター(札幌)
- ③ Atsushi Narumi “Synthesis of Maltopentaose-Conjugated Poly(*N,N*-diethylacrylamide) Block Copolymers by RAFT Polymerization and Their Thermoresponsive Self-Assembly into Nanoaggregates” 2015 Japan-France Joint Seminar on Functional Block Copolymer

(JFJS2015), 2015 年 6 月 1 日、北海道大学(札幌)

- ④ Atsushi Narumi “Biohybrid block-type copolymer synthesized through RAFT polymerization with maltopentaose-modified macro-CTA” 2014 Japan-France Joint Seminar on Functional Block Copolymer (JFJS2014), 2014 年 5 月 22 日、北海道大学(札幌)
- ⑤ 富樫大地、鳴海敦、川口正剛「生体機能性ナノ相分離構造を与える糖鎖末端修飾ポリマーの RAFT 重合による精密合成」第 19 回ペプチドフォーラム、2013 年 12 月 6 日、山形大学工学部(米沢)
- ⑥ 富樫大地、鳴海敦、川口正剛「Amphiphilic Biofunctional Polymer Synthesis Based on RAFT Polymerization using Water-soluble Oligosaccharide-modified Macro-CTA」第 62 回高分子討論会、2013 年 9 月 11 日～13 日、金沢大学角間キャンパス(金沢)
- ⑦ 富樫大地、鳴海敦、川口正剛「オリゴ糖鎖修飾水溶性マクロ CTA を用いた RAFT 重合による生体機能性両親媒性ブロックコポリマーの精密合成」第 41 回東北地区若手研究会夏季ゼミナール、2013 年 8 月 5 日～7 日、清稜山俱樂部(郡山)
- ⑧ 武田晃一、富樫大地、鳴海敦、川口正剛「オリゴ糖鎖担持水溶性マクロ CTA による RAFT 重合」第 62 回高分子年次大会、2013 年 5 月 29 日～31 日、京都国際会館(京都)

## 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・准教授  
研究者番号：60443975