

分担研究報告書
厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名
中間水コンセプトによる新規生体適合性高分子の合成

研究分担者 田中 賢 山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻

研究要旨：本研究では、ポリマー 水界面に形成される特殊な水和構造（中間水）の発現に関係していると推察されるエーテル結合に注目し、エチレングリコール構造を主鎖または側鎖に導入した新規ポリマーを regio 選択的な開環メタセシス重合法（ROMP）を用いて合成し、得られたポリマーが発現する水和構造と抗血栓性の相関性について検討した。エチレングリコール側鎖長を変更したポリマーでは、エチレングリコールユニット数の増加に伴う中間水量の増加が確認され、ポリマーの一次構造の制御によって中間水量の制御に成功した。

A．研究目的

ポリマー材料を用いた血液接触型医療デバイスには、デバイス表面での血栓形成を防止する抗血栓性が求められている。しかし、ポリマー材料が抗血栓性を発現するメカニズムは解明されていない。我々は、ポリマー 水界面に形成される特殊な水和構造（中間水）が抗血栓性の発現に寄与しているとの仮説に基づき、ポリマーの一次構造の制御による、水和構造と抗血栓性の制御、およびこれを通じた抗血栓性の発現メカニズムの解明を試みてきた。

本研究では、中間水の発現に関係していると推察されるエーテル結合に注目し、エチレングリコール（EG）構造を主鎖または側鎖に導入した新規ポリマーを regio 選択的な開環メタセシス重合法（ROMP）を用いて合成し（Scheme. 1）、得られたポリマーが発現する水和構造と抗血栓性の相関性について検討を行った。

B．研究方法

モノマーとしてアリル位に3つのEGユニットを有する cyclooctene (COE) 誘導体と2つのメトキシ基をトランス型もしくはシス形で導入したCOE誘導体を合成した。ROMPにより得られたポリマーの主鎖中の二重結合に対して水素添加反応を行い、定序的に側鎖が並んだethyleneとのモデル共重合体を合成した。ポリマーと相互作用する中間水を定量化するために、得られたポリマーを含水させてDSC測定を行なった。また、血小板粘着試験により抗血栓性を確認した。

C．研究結果

モノマーのROMPによりポリマーを合成した後に、¹H-NMR、¹³C-NMR、2次元NMRを用いた構造解析を行なった。側鎖が一定の間隔で導入されたポリマーの生成を確認した（Fig.1）。

EG側鎖長を変更したポリマーでは、EGユニット数の増加に伴う中間水量の増加が見られ、ポリマーの一次構造の制御によっ

で中間水量を制御することができた(Fig.2)。また、多置換体のDSC測定結果から、相互作用する中間水量は立体異性体でおおよそ変わらないことが明らかになった。t-PMMは1つのEGユニットを側鎖に有するm=1よりもポリマー鎖の分子運動性が低下する可能性があるため、t-PMMの中間水量はm=1よりも減少すると推測していた。t-PMMの中間水量を調べたところ、実際にm=1よりも少ない値を示しており、推測通りの結果が得られた。ポリマーの抗血栓性を評価するために、ヒト血小板粘着試験を行なった。EG側鎖長を変更したポリマーでは、EGユニット数の増加に伴った血小板粘着数の減少が見られた。さらに、2つ以上のEGユニットを有するポリマーはPMEAと同程度の血小板粘着数を示していた。また多置換体はm=0とm=1の間の血小板粘着数を示した(Fig.3)。

D . 考察

抗血栓性の発現に最も寄与しているポリマー特性を調べるために、血小板粘着数とポリマー特性の相関性について検討した。

ガラス転移温度や液滴法によって得られた接触角の値と血小板粘着数の関係を調べたが、高い相関は得られなかった。ポリマーの主鎖の分子運動性や材料表面の親水性だけでは抗血栓性の発現について説明できないことがわかった。次に、血小板粘着数と自由水、不凍水、中間水の関係について検討を行った。不凍水量や自由水量に対する血小板粘着数の関係を調べたところ、同じ不凍水量、自由水量を有するポリマーでも血小板粘着数に差が見られた。次に、中間水量と血小板粘着数の相関性について検討した(Fig. 4)。血小板粘着数と中間水量の相関性は他のポリマー特性よりも高く、中間水量の増加に伴った血小板粘着数の減少が見られた。またトランス体は、発現した中間水量から予測されたとおり、目的としていた m=0 と m=1 の間の血小板粘着数

を示した。さらに、m=2 の場合でも血小板粘着を PMEA と同程度に抑制していたことから、ポリマー中に中間水量が 0.01 g/g 存在すれば抗血栓性を発現する可能性があることが明らかになった。以上の結果から、中間水量が抗血栓性に与える影響について考察した。中間水が存在しない材料表面では、最表面の不凍水によって吸着タンパク質の構造変化が多く生じ、血小板が多く粘着したと考えられる。しかし、ポリマー中に中間水量が少なくとも 0.01 g/g 存在すれば、タンパク質と不凍水の接触を中間水が防ぐため、吸着タンパク質の構造変化と血小板粘着を抑制したと考えられる(Fig. 5)。

E . 結論

本研究ではポリマーの一次構造の制御による、水和構造と抗血栓性の制御に成功し、抗血栓性の発現メカニズムを解明するための新たな知見を得ることができた。

F . 研究発表

1. 論文発表

- (1) T. Hoshihara, M. Nikaido, M. Tanaka, Characterization of the mechanisms of attachment of tissue-derived cell lines to blood-compatible polymers, *Adv. Healthcare Mater.*, 3, 775-784 (2014).
- (2) M. Tanaka, K. Sato, E. Kitakami, S. Kobayashi, T. Hoshihara, K. Fukushima, Design of biocompatible and biodegradable polymers based on intermediate water concept, *Polym. J.*, doi:10.1038/pj.2014.129

2. 学会発表

大澤康平, 小林慎吾, 田中賢, 側鎖間隔を制御した新規アミド基導入ポリマーの合成, 第63回高分子学会年次大会(2014/5/28-30, 名古屋)

戸来奎介, 福田考作, 小林慎吾, 田中賢, 側鎖-側鎖間の炭素数を制御した新規 PMEA 類似体の合成とその抗血栓性評価, 第63回高分子学会年次大会(2014/5/28-30, 名古屋)

福田考作,戸来奎介,小林慎吾,田中賢,regio 選択的な開環メタセシス重合による定序性ポリ(3,4-ジメトキシシクロオクテン)の合成とその抗血栓性評価,第 63 回高分子学会年次大会(2014/5/28-30,名古屋)

片岡真依子,岩田幸久,小林慎吾,田中賢,Regio 選択的な開環メタセシス重合を用いた新規 PTHFA 類似体の合成とその血液適合性評価,第 63 回高分子学会年次大会(2014/5/28-30,名古屋)

Meng-Yu TSAI, Yuto INOUE, Takayuki OTA, Kazuki FUKUSHIMA, Masaru TANAKA, DSC Study of Hydrated Aliphatic Carbonyl Polymers, 第 63 回高分子学会年次大会(2014/5/28-30,名古屋)

井上裕人,佐藤千香子,佐々木彩乃,福島和樹,田中賢,抗血栓性脂肪族ポリカーボネートの細胞接着性と生分解性,第 63 回高分子学会年次大会(2014/5/28-30,名古屋)

太田貴之,蔡孟諭,福島和樹,田中賢,エーテル置換基を有する環状カルボニル化合物の合成と開環重合,化学系学協会東北大会(2014/9/20-21,米沢)

片岡真依子,岩田幸久,小林慎吾,田中賢,テトラヒドロフラン環を側鎖に有する定序性ポリマーの合成,化学系学協会東北大会(2014/9/20-21,米沢)

大澤康平,小林慎吾,田中賢,側鎖間隔を制御した新規アミド基導入ポリマーの合成とその水和構造解析,化学系学協会東北大会(2014/9/20-21,米沢)

泉井美幸,岩田幸久,小林慎吾,田中賢,Poly(ω -methoxyalkyl acrylate)類の合成と抗血栓性評価,化学系学協会東北大会(2014/9/20-21,米沢)

甘三奇,小林慎吾,田中賢,水酸基を有するポリ(メタ)アクリレート誘導体の合成とその血液適合性評価,化学系学協会東北大会(2014/9/20-21,米沢)

福島和樹,太田貴之,高岡駿矢,佐藤駿介,松崎

広大,岸昂平,有機分子触媒を用いた機能性バイオマテリアルの精密合成,第 63 回高分子討論会(2014/9/24-26,長崎)

福島和樹,蔡孟諭,太田貴之,井上裕人,岸昂平,田中賢,脂肪族エステル系ポリマーの抗血栓性と水和に及ぼす構造因子の解析,第 63 回高分子討論会(2014/9/24-26,長崎)

干場隆志,佐藤一博,大類寿彦,丸山寛花,遠藤千穂,田中賢,中間水が異なる高分子による細胞接着の制御とその応用,第 63 回高分子討論会(2014/9/24-26,長崎)

小林慎吾,福田考作,戸来奎介,北上恵理香,片岡真依子,大澤康平,regioselective ROMP 法を用いた定序性高分子の合成とバイオマテリアルへの応用,第 63 回高分子討論会(2014/9/24-26,長崎)

大澤康平,小林慎吾,田中賢,Regio 選択的な開環メタセシス重合による側鎖間隔を制御した新規アミド基導入ポリマーの合成とその水和構造解析,第 63 回高分子討論会(2014/9/24-26,長崎)

Shenyao Xue, Shingo Kobayashi, Masaru TANAKA, Hiroyuki Furusawa, Measurements of Hydration Amount and Viscoelasticity of Biocompatible Polymers using Quartz-Crystal Microbalance with Dissipation Technique, SmsSys2014(2014/10/15-17,米沢)

大澤康平,小林慎吾,田中賢,Synthesis of Polymers Having Amide Side-chains and Analysis of Hydration Structure, SmsSys2014(2014/10/15-17,米沢)

岸 昂平,井上裕人,佐々木彩乃,佐藤千香子,田中賢,福島和樹, Polymeric Degradable Antimicrobials with Enhanced Blood Compatibility, SmsSys2014(2014/10/15-17,米沢)

田中賢,佐藤一博,北上恵理香,小林慎吾,干場隆志,福島和樹,中間水コンセプトによる生体親和性高分子の設計と診断・治療デバイスへの応用,第23回ポリマー材料フォーラム(2014/11/6-7,奈良)

泉井美幸, 岩田幸久, 小林慎吾, 田中賢, Poly(ω -methoxyalkyl acrylate)類の合成と抗血栓性評価, 第25回バイオマテリアル若手研究会 (2014/11/6-7, 八王子)

片岡真依子, 小林慎吾, 田中賢, テトラヒドロフラン環を側鎖に有する定序性高分子の合成と抗血栓性評価, 2014 高分子学会東北支部会 (2014/11/13-14, 郡山)

福島和樹, 機能性脂肪族ポリカーボネートを用いたバイオメディカル材料の新展開, 2014 高分子学会東北支部会 (2014/11/13-14, 郡山)

佐藤一博, 小林慎吾, 綿引省吾, 及川昌彦, 干場隆志, 田中賢, エチレングリコール鎖に注目した Poly(2-methoxyethyl acrylate)類似体の高分子-水相互作用の解析と抗血栓性評価, 第36回日本バイオマテリアル学会大会 (2014/11/17-18, 東京)

片岡真依子, 小林慎吾, 田中賢, テトラヒドロフラン環を側鎖に有する定序性高分子の合成と抗血栓性評価, 第36回日本バイオマテリアル学会大会 (2014/11/17-18, 東京)

福田考作, 戸来奎介, 小林慎吾, 田中賢, ポリ(3,4-ジメトキシシクロオクテン)の合成とその抗血栓性評価, 第36回日本バイオマテリアル学会大会 (2014/11/17-18, 東京)

泉井美幸, 岩田幸久, 小林慎吾, 田中賢, Poly(ω -methoxyalkyl acrylate)類の合成と抗血栓性評価, 第36回日本バイオマテリアル学会大会 (2014/11/17-18, 東京)

井上裕人, 佐藤千香子, 佐々木彩乃, 福島和樹, 田中賢, 抗血栓性を示す生分解性ポリカーボネートを含むポリウレタンの合成と特性評価, 第36回日本バイオマテリアル学会大会 (2014/11/17-18, 東京)

太田貴之, 蔡孟諭, 井上裕人, 福島和樹, 田中賢, 生分解性ポリマーの水和に関する構造因子の解析と抗血栓性への効果, 第36回日本バイオマテリアル学会大会 (2014/11/17-18, 東京)

甘三奇, 小林慎吾, 田中賢, Water structure of blood compatible poly[hydroxyalkyl(meth)acrylate]s, 第36回日本バイオマテリアル学会大会 (2014/11/17-18, 東京)

戸来奎介, 福田考作, 小林慎吾, 田中賢, Synthesis and blood-compatibility evaluation of novel PMEA analogs having precisely placed side-chain branches, 第10回 IPC2014 (2014/12/2-5, つくば)

片岡真依子, 小林慎吾, 田中賢, Synthesis of novel polymers having precisely placed tetrahydrofurfuryl side-chain branches via regioselective ring-opening metathesis polymerization and their blood compatibility evaluation, 第10回 IPC2014 (2014/12/2-5, つくば)

福田考作, 小林慎吾, 田中賢, Synthesis of sequence- and geometry-specific poly(3,4-dimethoxycyclooctene)s and their antithrombotic evaluation, 第10回 IPC2014 (2014/12/2-5, つくば)

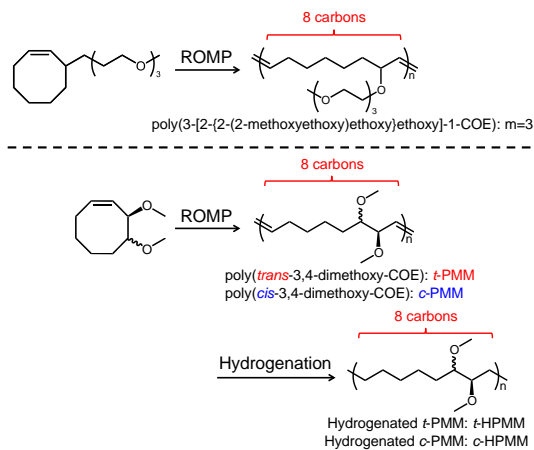
佐藤一博, 小林慎吾, 綿引省吾, 及川昌彦, 干場隆志, 田中賢, The relationship between water structure and blood compatibility in poly(2poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) analogues, 第10回 IPC2014 (2014/12/2-5, つくば)

福島和樹, 井上裕人, 岸昂平, 太田貴之, Meng-Yu TSAI, 佐藤駿祐, 松崎広大, Functional Degradable Biomaterials Based on Organocatalysis and Substituted Cyclic Carbonates, 第10回 IPC2014 (2014/12/2-5, つくば)

小林慎吾, 福田考作, 戸来奎介, 片岡真依子, 大澤康平, 田中賢, Synthesis of Sequence-specific Polymers via Regioselective ROMP and Biomaterial Applications, 第10回 IPC2014 (2014/12/2-5, つくば)

甘三奇, 小林慎吾, 田中賢, Synthesis and anti-thrombotic evaluation of novel PHEMA analogs having different side-chain structures, 第10回 IPC2014 (2014/12/2-5, つくば)

大澤康平,小林慎吾,田中賢,Synthesis of novel regioregular polymers having amide side-chains via regioselective ring-opening metathesis polymerization and their biocompatibility evaluation,第10回 IPC2014 (2014/12/2-5,つくば)



Scheme. 1 ROMPと水素添加反応によるポリマー合成

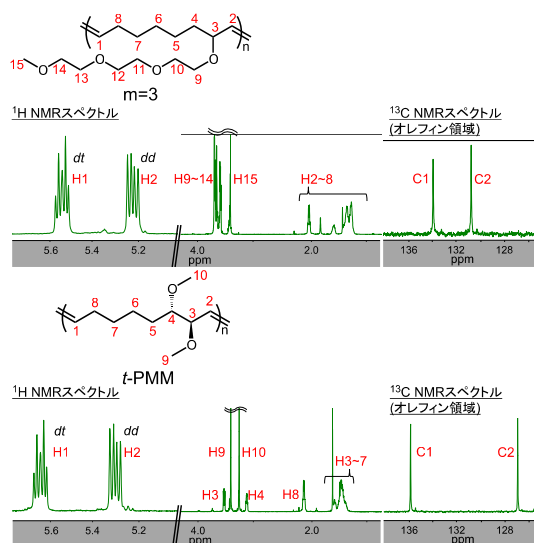


Fig. 1 $m=3$ と*t*-PMMのNMRの測定結果

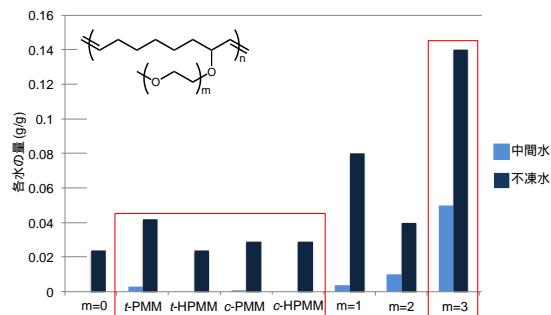


Fig. 2 中間水と不凍水の定量結果

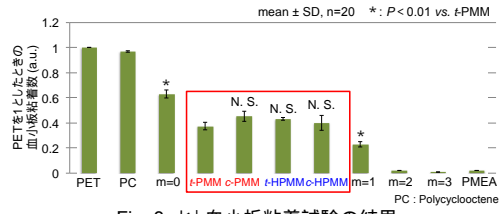


Fig. 3 ヒト血小板粘着試験の結果

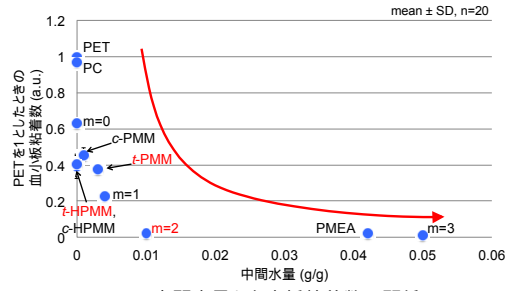


Fig. 4 中間水量と血小板粘着数の関係

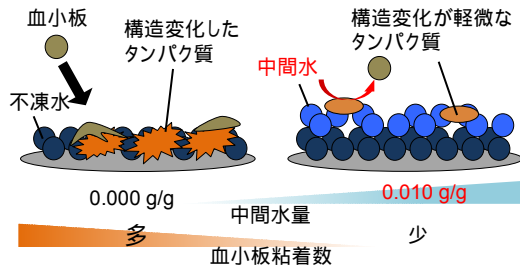


Fig. 5 中間水量が抗血栓性に及ぼす影響