

ポリビニレンカーボネート及びその誘導体の合成と 血小板粘着特性

金 城 木 綿*¹
山 田 悟*²
松 野 寿 生*³
田 中 敬 二*³

Synthesis and Platelet Adhesion on Films of Poly(vinylene carbonate) and Its Derivatives

Yu KANESHIRO
Satoru YAMADA
Hisao MATSUNO
Keiji TANAKA

Poly(vinylene carbonate) (PVCA) was synthesized by typical bulk radical polymerization. Cyclic carbonate groups in PVCA can react with amino groups, so Poly(β -hydroxyvinyl N-substituted carbamate)s (PHCs) were synthesized by aminolysis reactions of PVCA and identified by NMR spectroscopy. The films of PVCA and PHCs were prepared by spin-coating method onto Si wafers. Aggregation states of these polymers and blood platelet adhesion behaviors on them were investigated. The number and activation degree of platelets on the various PHC films were strongly correlated to their surface/interfacial free energies. But this was not the case for the PVCA film.

1. はじめに

医療用デバイスの血液適合性（生体適合性）の向上を目的に、ヘパリン等の抗血液凝固活性をもつ物質を基材表面にコーティングする技術が多く用いられている¹⁾。しかしながら、ヘパリン等は動物臓器から抽出された生物由来物質であるため、その安全性に課題があり、非生物由来のコーティング材料が求められている。

一方、合成高分子の界面における凝集状態や物理特性はコーティング材料や薄膜デバイスの性能に強く影響を与える。これら凝集状態や物理特性をより理解す

ることは、コーティング材料や薄膜デバイスに止まらず機能材料全体の発展に対して極めて重要である²⁾。田中らはこれまでに、高分子鎖の水界面での局所配向や分子運動性が血小板粘着挙動にいかに関与するかを研究してきた^{3)~5)}。血小板は高分子材料の界面状態に非常に敏感であり、粘着数、偽足形成、伸展程度の点から見た血小板の粘着挙動は、バイオセンサーや人工心肺などといった生体デバイスの設計に重要な指針を与える⁶⁾。

ポリ（ビニレンカーボネート）（PVCA）は、加水分解によりアミノ化合物と容易に反応するため、アミノ化合物を選択することで、適度な親水性や界面における分子運動性を付与することができる。本報告では、PVCA と、カルバメート基を持つ PVCA 誘導体、すなわちポリ（N 置換カルバミン酸 β -ヒドロキシビニル）

*1 ファンクショナルポリマー研究所/環境バイオグループ

*2 ライフサイエンス研究所/バイオマテリアルグループ

*3 九州大学大学院工学研究院応用化学部門

(PHCs)を合成し、ポリマー鎖の凝集状態が血小板粘着、活性化挙動に及ぼす影響を検討した。

2. 実 験

[1] 試 薬

PVCAの原料となる炭酸ビニレンはハイケム株式会社より入手した。その他の試薬(和光純薬工業)は購入品をそのまま用いた。

[2] PVCA および PHCs の合成

(1) ビニレンカーボネートの重合

既報⁷⁾を参考に、ビニレンカーボネートの重合を行い、PVCA (1) を合成した。

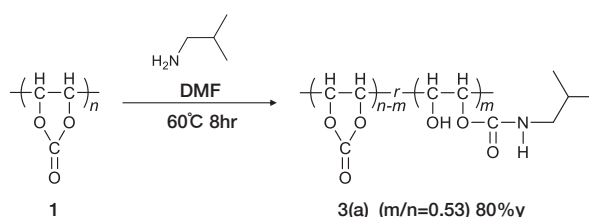
ガラス製アンプル管に所定量のビニレンカーボネート、アゾ開始剤、連鎖移動剤としてジメチルホルムアミド(DMF)を加え、封管した後、60°Cで振盪した。18時間後、アンプル管を開封して内容物を取り出し、DMFに溶解させ、過剰のイソプロパノール中に滴下することでポリマーを析出させた。析出したポリマーをろ過した後、真空下、80°Cで18時間乾燥させ、収率約60%でPVCAを得た。

(2) PVCA のアミノリシス反応

PVCAの環状カーボネート基に対して、一級アミン

(*n*-ヘキシルアミン、2-メトキシプロピルアミン、2-テトラヒドロフルフリルアミン)を用いてアミノリシス反応を行い、側鎖に水酸基とカルバメート基をもつPHCs (2,3a,3b,4a,4b,5)を合成した⁸⁾。例として、3aの合成をScheme 1に示す。Figure 1に各種ポリマーの構造式と、PHCsの収率を示す。

PVCAをDMF中に溶解し、所定量のアミンを加え、窒素雰囲気下、60°Cで反応を行った。反応中、サンプルリング物をガスクロマトグラフで分析して反応追跡を行った。PVCAのアミノリシス化の割合は加えるアミンの量でコントロールした。反応終了後、窒素雰囲気下、メチルエチルケトン(MEK)中に滴下することでポリマーを析出させた。析出したポリマーを濾過し、MEKで洗浄した後、真空下、常温で一晩乾燥させた。得られた白色固体をヘキサンで10時間ソックスレー抽出した後、真空下、100°Cで8時間乾燥させ、PHCs



Scheme 1 Synthesis of PHCs(3a)

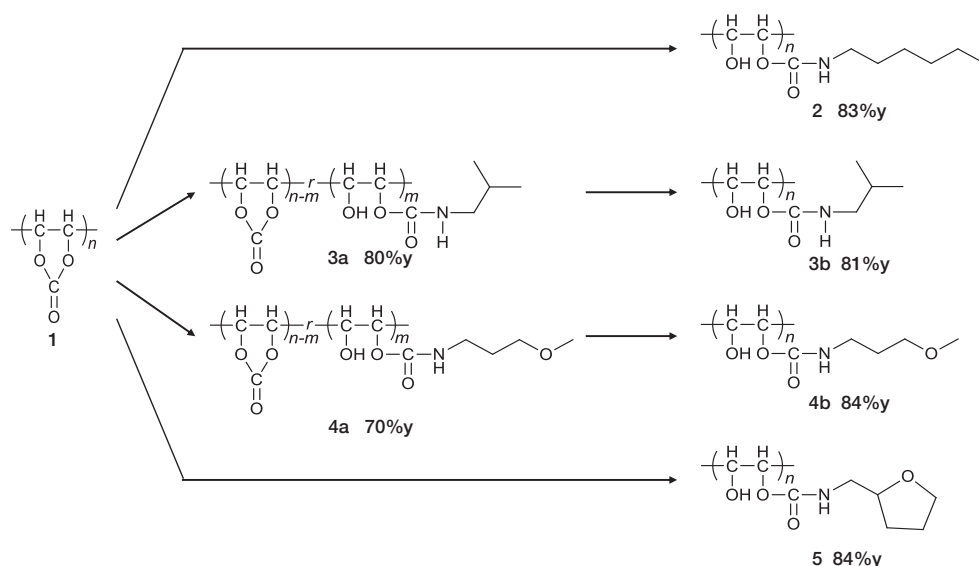


Figure 1 Chemical structures of PVCA (1) and PHCs having hydroxy groups in addition to N-n-hexylcarbamate (2), N-2-methylpropylcarbamate (3a, 3b), N-3-methoxypropylcarbamate (4a, 4b), or N-2-tetrahydrofurylmethylcarbamate (5) groups in the side chains

Note, $0 \leq m \leq n$

[出典: Hisao Matsuno *et al.*, *Chem.Lett.*, **45**, 913-915 (2016)⁹⁾]

Table 1 Characteristics of PVCA and PHCs used in this study

Polymer	M _n ^a	PDI ^b	m/n
1	24.0k	2.5	0
2	27.0k	2.3	1
3a	26.2k	2.1	0.53
3b	23.5k	2.3	1
4a	28.0k	2.2	0.50
4b	27.0k	2.3	1
5	22.0k	2.4	1

^aThe number-average molecular weight (M_n) and ^bpolydispersity index (PDI) determined by gel permeation chromatography.

[出典: Hisao Matsuno *et al.*, *Chem.Lett.*, **45**, 913-915 (2016)⁹⁾

(2,3a,3b,4a,4b,5) を得た。Table 1 に各種ポリマーの性質をまとめた。

[3] 測定

(1) アミノリシスの追跡

反応液中の成分を、ガスクロマトグラフ (島津製作所製 GC-14B) を用いて分析した。分離カラムはキャピラリーカラム Inert Cap for Amine (長さ 60m、内径 0.32mm) 用い、内部標準物質としてナフタレンを用いて内部標準法により測定した。

(2) 重合体の組成

重合体の同定、および PHCs のカーバメイト基を含む単位 (m) と環状カーボネート基単位 (n-m) の比率は、プロトン核磁気共鳴分光 (¹H-NMR) スペクトル分析、カーボン核磁気共鳴分光 (¹³C-NMR) スペクトル分析より求めた。例として、3a の ¹³C-NMR スペクトルを Figure 2 に示す。

(3) 重合体の物性

重量平均分子量 (M_w)、数平均分子量 (M_n) および重量平均分子量と数平均分子量の比 (M_w/M_n) は、ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー (GPC)

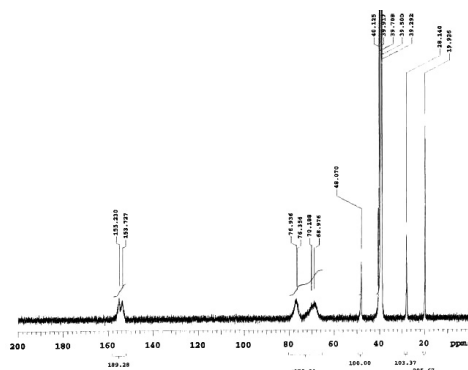


Figure 2 ¹³C-NMR spectrum of PHCs (3a)

によって測定した。GPC 装置としては東ソー (株) 製 HLC-8120GPC を用い、カラムとしては東ソー (株) 製 TSKgel SuperAWM-H を用い、カラム温度を 40℃ に設定し、溶離液として LiBr (10mM) 含有 DMF を用いて測定した。測定試料は 1.0mg/ml の濃度で調製し、0.2ml 注入して測定した。分子量の検量線は、分子量既知のポリエチレンオキサイド試料を用いて校正した。なお、M_w および M_n はポリエチレンオキサイド換算の値として求めた。

[4] 評価

(1) 製膜

PVCA 及び PHCs をテトラヒドロフラン (THF) に溶解させ、シリコン基板上にスピコートし、室温で 24 時間真空乾燥させた。膜の厚さは約 200nm であった。

(2) 製膜性評価

製膜したシリコン基板を水浸漬させ (室温、24 時間)、前後の光学顕微鏡観察を行った。Figure 3 に水浸漬後の PVCA と PHC の膜の光学顕微鏡の画像 (a ~ e) と、参考として市販の PET シート (帝人デュポン製) (f) を示す。1 ~ 4a において、水浸漬前後で膜の崩壊は観測されず、安定な膜であることを確認した。4b と 5 は水溶性が高いため、水と接触した際に膜が崩壊した。従って、以下は 4b と 5 を除く薄膜について議論する。

(3) 表面自由エネルギーによる濡れ性評価

大気下、室温において、液滴投下による静的接触角測定を行った。液滴として水およびヨウ化メチレンを用いて測定した接触角 (θ_i) から膜表面のポリマーの凝集状態を考察した。それぞれの接触角を用いて、Owens の式(1)から膜表面の自由エネルギーと (γ_s) と水浸漬後 (24 時間) の膜表面の自由エネルギー ($\gamma_{s(w)}$) を算出した¹⁰⁾。

$$\gamma (1 + \cos \theta) = 2\sqrt{\gamma_s^d \gamma^d} + 2\sqrt{\gamma_s^h \gamma^h} \quad (1)$$

Table 2 にそれぞれの接触角測定の結果と γ_s 、 $\gamma_{s(w)}$ を示す。

(4) 血小板粘着特性評価

膜表面の血液に対する抗血栓性を調べるために、シリコン基板に成膜した各種ポリマー薄膜について、血小板粘着試験を行った。各膜は、リン酸緩衝液 (PBS 溶液) に暴露しないもの、PBS 溶液に 24 時間暴露し

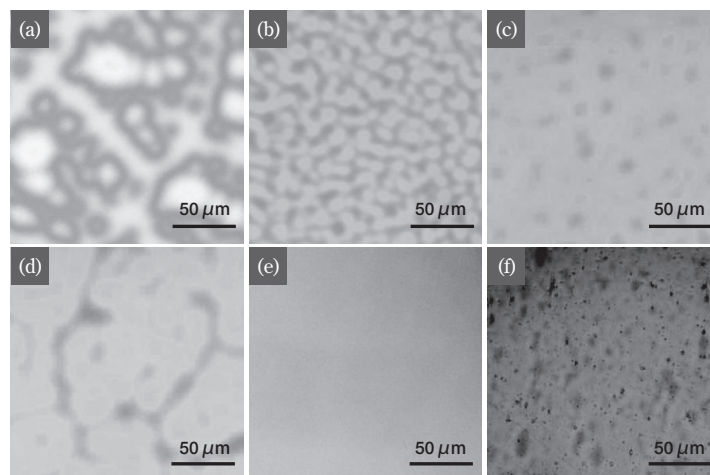


Figure 3 Digital microscopic images for spin-coated films of (a) 1, (b) 2, (c) 3a, (d) 3b, (e) 4a, and for (f) a PET sheet.

[出典: Hisao Matsuno *et al.*, *Chem.Lett.*, **45**, 913-915 (2016)⁹⁾]

Table 2 The θ_i , γ_s and $\gamma_{s(w)}$ values for each film. Probes (i); H₂O and CH₂I₂ droplets for surfaces, an air bubble and a C₇H₁₆ droplet for water interfaces.

Film	θ_{H_2O} /°	$\theta_{CH_2I_2}$ /°	γ_s / mJm ⁻²	θ_{air} /°	$\theta_{C_7H_{16}}$ /°	$\gamma_{s(w)}$ / mJm ⁻²
1	48.1 ± 1.3	47.4 ± 1.2	53.2	ND ^a	ND ^a	ND ^a
2	97.0 ± 1.1	61.4 ± 0.8	27.8	117.4 ± 1.2	95.4 ± 0.6	11
3a	83.5 ± 0.6	55.4 ± 0.9	33.0	128.1 ± 0.9	117.5 ± 2.7	3.7
3b	87.5 ± 0.5	43.8 ± 0.5	37.8	125.5 ± 0.4	109.4 ± 1.8	5.9
4a	59.2 ± 0.7	40.1 ± 0.6	48.5	143.7 ± 0.8	132.1 ± 1.7	1.5
PET	78.8 ± 0.3	36.0 ± 4.3	42.6	108.9 ± 0.9	70.5 ± 1.4	28

^aND; not determined.

[出典: Hisao Matsuno *et al.*, *Chem.Lett.*, **45**, 913-915 (2016)⁹⁾]

たものを用いた。

試験に用いた血液は、ヒト肘静脈より採血した血液をクエン酸ナトリウムで抗凝固処理した多血小板血漿として調節した。調製した多血小板血漿を各膜の表面に60分間接触させ、PBS溶液でリンス後、粘着した血小板の数および形態を走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。

3. 結果と考察

(1) 表面自由エネルギーによる濡れ性評価

Table 2 より、最も疎水性を示したのは PHC(2) であり、最も親水性を示したのは PVCA であった。

PHC 膜において、 γ_s の値に基づく疎水性の順位 (2>3a>3b>4a) は、側鎖にエーテル酸素を有している

か否かという観点から説明することができる。一方、 $\gamma_{s(w)}$ の値から、水と接触した後、順位は変わることが分かった (2>3b>3a>4a)。これは、水によって誘発される膜の表面再編成の度合いがそれぞれ異なっているためである。一方、PVCA 膜の θ_{air} と $\theta_{C_7H_{16}}$ の値にはほとんど差がなく、両プローブは水中では膜表面にくっつかなかった。この現象はより高い親水性表面に起こるものであり^{3b)}、PVCA は、水、空気中の両方において、最も親水的の界面をもつことが分かった。

(2) 血小板粘着特性評価

Figure 4 にあらかじめ PBS 溶液に暴露しなかったスピコート薄膜 (a ~ e) および PET (f) シートの血小板粘着の走査電子顕微鏡 (SEM) 画像を示す。定量的なデータは Figure 4 の (g)、(h) に示す。

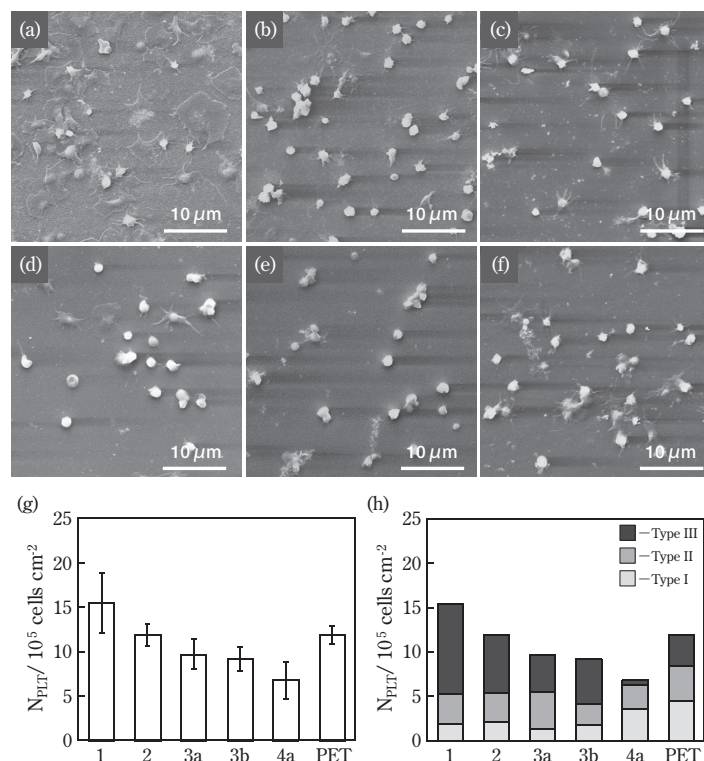


Figure 4 SEM images of platelets adhered on thin films of (a) 1, (b) 2, (c) 3a, (d) 3b, and (e) 4a, and on (f) a PET sheet without pre-immersion in a PBS solution (g) The N_{PLT} for each film and (h) its breakdown classified into three stages based on the degree of activation of platelets adhered.

[出典: Hisao Matsuno *et al.*, *Chem.Lett.*, **45**, 913-915 (2016)⁹⁾

血小板の活性化程度は、球状の血小板 (type I)、少量の偽足形成が生じた円形 (type II、部分的に活性化した血小板)、多くの偽足形成が生じた扁平形 (type III、血栓を形成しやすい活性化血小板) の三種類に分類される⁶⁾。PHC膜では、血小板粘着の数 (N_{PLT}) の順列 (2>3a>3b>4a) は、 γ_s 値と相関している。また、血小板の活性化程度も同じ順序となった。一見すると、血小板粘着挙動は、用いたポリマーの γ_s 値によって制御されるように思える。しかしながら、PVCA膜とPET膜では当てはまらない。PVCAは用いられたサンプルの中で最も親水性であるが、PVCA膜の N_{PLT} と活性化程度は最も高い。従って、表面の親水性は生物不活性性を制御する要因の一つではあるが¹¹⁾、常に優位となるとは限らない^{3,5)}。

Figure 5 には、膜をあらかじめPBS溶液に24時間暴露したスピコート薄膜(a~e)およびPET(f)シートの血小板粘着のSEM画像を示す。定量的なデータは **Figure 5** の (g)、(h) に示す。

PHC膜では、 N_{PLT} の順序 (2>3b>3a.>4a) となり、の最大値と最小値である2と4aについては、事前の暴露に依存しなかったが、3aと3bの順序は暴露後入

れ替わり、 $\gamma_{s(w)}$ 値の順序と相関があった。膜の最外層におけるポリマーの凝集状態は、周囲媒体に強く依存する。従ってこの場合、膜を長時間PBS溶液に暴露することで、粘着試験の前に、膜の表面構造再編成が十分に起こっているため、血小板粘着挙動の結果は、 γ_s 値よりむしろ $\gamma_{s(w)}$ 値と相関がある。従って、PHC誘導体における血小板粘着は $\gamma_{s(w)}$ 値によって制御されることが明確になった。

一方で、PVCA膜の血小板粘着挙動は、PHC膜とは異なる傾向を示した。PBS溶液に暴露した場合、 N_{PLT} の値は減少し、type IIIの活性が著しく抑制された。この特性は、PVCAが水と接触することでポリマー鎖の表面再編成が起こることに関係している。PVCAの化学構造から、PVCAの主鎖の部分である疎水的なメチン基は、空気中において膜の最外層に位置しているとされるが、親水的なカーボネート基が大きく寄与するため、PVCAの γ_s 値は、最も高い値となった。水溶液中にPVCA膜を浸漬させると、メチン基による水界面への効果は減少するため、より親水的な界面を形成する。その結果として、PVCA膜上の血小板粘着が抑制された。しかしながら、 N_{PLT} 値は、PVCAよりも親

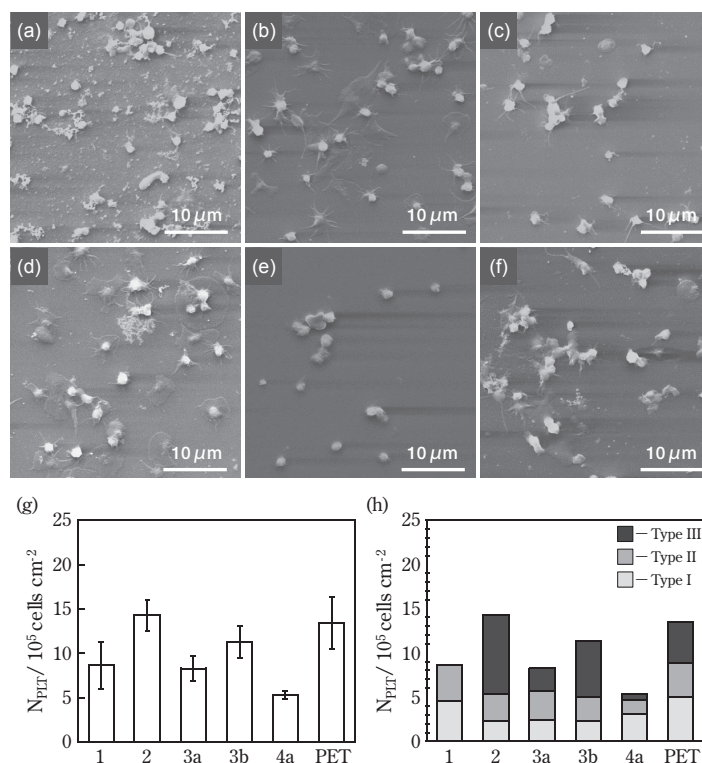


Figure 5 SEM images of adhesive platelets on thin films of (a) 1, (b) 2, (c) 3a, (d) 3b, and (e) 4a and on (f) a PET sheet with pre-immersion in a PBS solution for 24 h (g) The NPLT for each film and (h) its breakdown classified into three stages based on the degree of activation of the platelet.

[出典: Hisao Matsuno *et al.*, *Chem.Lett.*, **45**, 913-915 (2016)⁹⁾

水性の低い 3a, 4a の場合より依然として大きかった。考えられる理由は 2 つあり、ひとつは、PVCA の側鎖のカルボニル基の有無である。これまでに、ポリメタクリレートのカルボニル基は水分子と強い水素結合を形成するために水相側へ配向しやすいことが明らかにされている。これにより、界面において、生体不活性化性質とは逆方向に寄与する水分子の高秩序なネットワーク構造の形成が生じる^{12,13)}。従って、PVCA 表面において、より高い親水性を持つにもかかわらず、血小板が接着し、活性化が起こった。もうひとつは、水界面における側鎖の運動性である。側鎖の局所ダイナミクスは、主鎖よりも速いとされる、しかしながら PVCA の場合、側鎖のカルボニル基は、主鎖骨格の C-C 結合により環化されている。それ故、その運動性は、一次の側鎖基と比較してそれほど早くないと考えられる。高分子の低い運動性もまた、生体不活性化に対して優位ではないとされる^{3a)}。

4. まとめ

PVCA をラジカル重合で合成し、PVCA を種々の 1

級アミンを用いてアミノリシス反応を行い、誘導体となる側鎖に水酸基とカルバメート基をもつ PHCs を合成した。ポリマーをコーティングした膜表面のポリマーの凝集状態と、血小板粘着挙動について観察を行った。PHC 膜上での血小板粘着と活性化は、表面および界面自由エネルギーと強い相関性を示し、一方、PVCA 膜では付加的要因が考慮された。これらの基礎知識が、高い生体不活性化が要求されるバイオメディカルデバイスの設計に役立つことを期待する。

参考文献

- 1) a) サイエンス & テクノロジー、生体適合性制御と要求特性掌握から実践する高分子バイオマテリアルの設計・開発戦略、39-44 (2014)
- 2) R.A.L. Jones, R.W. Richerds, *Polymers at Surfaces and Interfaces*, Cambridge University Press (1999)
- 3) a) T.Hirata, H.Matsuno, D.Kawaguchi, T.Hirai, N.L.Yamada, M.Tanaka, K.Tanaka, *Langmuir*, **31**, 3611 (2015) b) T.Hirata, H.Matsuno, D.Kawaguchi, N.L.Yamada, M.Tanaka, K.Tanaka,

- Phys. Chem. Chem Phys., **17**, 17399 (2015) c)
T.Hirata, H.Matsuno, D.Kawaguchi, N.L.Yamada,
M.Tanaka, K.Tanaka, *Polymer*, **78**, 219 (2015)
- 4) H.Matsuno, R.Tsukamoto, S.Shinomura, T.Hirai,
Y.Oda, K.Tanaka, *Polymer J.*, in press, doi:
10.1038/pj.2015.118
- 5) Y.Oda, C.Zhang, D.Kawaguchi, H.Matsuno,
S.Kanaoka, S.Aoshima, K.Tanaka, in press, doi:
10.1002/ admi.201600034.
- 6) a) Tanaka, T.Motomura, M.Kawada, T.Anzai,
Y.Kasori, T.Shiroya, K.Shimura, N.Onishi,
A.Mochizuki, *Biomaterials*, **21**, 1471 (2000) b)
M.Tanaka, A.Mochizuki, N.Ishii, T.Motomura,
T.Hatakeyama, *Biomacromolecules*, **3**, 36 (2002)
- 7) a) 綱本博孝、大阪市立大、炭酸ビニレンの重
合、共重合、ならびにポリマーの性質 (1988) b)
G.Smets, K.Hayashi, *J. Polym. Sci.*, **29**, 257 (1958)
- 8) a) V.D.Nemirovskii, M.A.Pavlovskaya,
V.V.Stepanov, S.Skorolhodov, *Polym. Sci. USSR*,
7, 1750 (1965) b) L.Ding, Y.Li, Y.Li, Y.Liang,
J.Huang, *Eur. Polym. J.*, **37**, 2453 (2001) c)
Y.Kaneshiro, H.Miyata, Jpn. Pat. JP P2015-196738A
(2015)
- 9) H.Matsuno, R.Tsukamoto, Y.Kaneshiro, S.Yamada,
K.Tanaka, *Chem. Lett*, **45**, 913-915 (2016)
- 10) D.K.Owens, R.C.Wendt, *J. Appl. Polym. Sci.*,
13, 1741 (1969)
- 11) S.hen, L.Li, C.Zhao, J.Zheng, *Polymer*, **51**, 5283
(2010)
- 12) a) A.Horinouchi, H.Atarashi, Y.Fujii, K.Tanaka,
Macromolecules, **45**, 4638 (2012) b) Y.Oda,
A.Horinouchi, D.Kawaguchi, H.Matsuno,
S.Kanaoka, S.Aoshima, K.Tanaka, *Langmuir*,
30, 1215 (2014)
- 13) Y. Tateishi, N. Kai, H. Noguchi, K. Uosaki, T.
Nagamura, K. Tanaka, *Polym. Chem.*, **1**, 303 (2010)

