東海大学紀要工学部
Vol.48, No.1, 2008, pp.11-18

新規ホスホリルコリン基含有ジアミンモノマーを用いた芳香族ポリアミドの合成と生体適合性

堀口　健二*1・下山田　直矢*1・長瀬　裕*2・岩崎　泰彦*3・石原　一彦*4

Synthesis and Biocompatibility of Aromatic Polyamides by Using Novel Diamine Monomers Containing Phosphorylcholine Moiety

by

Kenji HORIGUCHI*[1], Naoya SHIMOYAMADA *[1], Yu NAGASE*[2], Yasuhiko IWASAKI*[3] and Kazuhiko ISHIHARA*[4]

(Received on March 15, 2008, Accepted on July 9, 2008)

Abstract

The synthesis of novel aromatic diamine compounds containing phosphorylcholine (PC) group with different spacer structures was carried out, which gave the high molecular weight polyamides with PC group by polycondensation. The obtained polymers were soluble in specific solvents such as dimethylsulfoxide (DMSO), *N*,*N*-dimethylformamide (DMF) and 1-methyl-2-pyrrolidinone (NMP) at room temperature. This solubility of polymers is an advantage in the production process for medical devices. From the results of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), the N_{1s} and P_{2p} peaks were clearly observed on the polymer surface, and these polymers exhibited the excellent biocompatibility, which would be due to the surface structure derived from PC side chain. In addition, the obtained polymers showed the high thermal stability up to 250℃, at which the thermal degradation of PC moiety would occur. Therefore, these polyamides are expected as tough biocompatible materials for the use of biomedical devices.

Keywords: Biomaterial, Biocompatibility, Diamine monomer, Aromatic polyamides, Phosphorylcholine

1．緒　言

近年，医療分野において様々な高分子材料が医療器具だけでなく血液と直接接触するような人工臓器としても用いられている．例えばセグメント化ポリウレタンやポリジメチルシロキサン，ポリテトラフルオロエチレンは人工血管や人工心臓などに用いられる代表的な医療用高分子材料である．しかしながら，それらのポリマーが血液成分と接触した際，多くのタンパク質や血液成分がポリマー表面に吸着してしまうため，それらの材料は限られた期間もしくは手術時だけの一時的な利用にとどまっている．

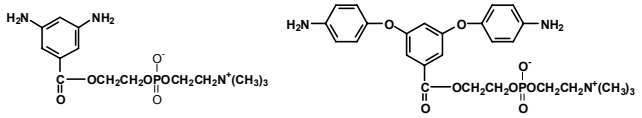
一方，最も理想的な血液適合性表面は血管の内側表面，すなわち生体膜である．その生体膜構造を高分子によって構築するというコンセプトのもと，2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーが開発された[1]．MPC ポリマーは生体膜の構成成分であるリン脂質の極性基の一種，ホスホリルコリン(PC)基をポリマー側鎖に有し，タンパク質の吸着や血液成分の粘着を効果的に抑制するという優れた表面特性を示した[1]．それ故，現在 MPC ポリマーは様々な形や方法でバイオマテリアルとして用いられ，その用途をさらに拡大すべく多くの研究が幅広く行われている[2-8]．しかしながら，MPC ポリマーは医療現場で多用されるアルコールに対する十分な耐久性がなく[9]，主鎖構造であるメタクリル酸ユニットの性質が影響して，機械的特性や耐熱性が十分でないと考えられる．

そこで我々は，以前の研究で主鎖に耐熱性や機械的強度に優れる構造を取り入れることで更なる用途の拡大が見込めるのではないかと考え，2-（3,5-ジアミノフェニルカルボニルオキシ)エチルホスホリルコリン（Fig.1 中

＊1　工学研究科工業化学専攻博士前期課程
＊2　工学部応用化学科教授
＊3　関西大学化学生命工学部准教授
＊4　東京大学工学研究科マテリアル工学専攻教授

DAPC）と他のコモノマー，および酸クロリドとの重縮合反応により PC 基含有芳香族ポリアミドを合成した[10),11)]．得られた共重合体は優れた血液適合性を示したものの，**DAPC** の低い反応性と高い吸湿性が影響し、分子量が低く自立膜が得られなかった．

本研究では **DAPC** が抱える問題を解決するために，新規な PC 基含有ジアミンモノマー，2-[3,5-ビス(4-アミノフェノキシ)フェニルカルボニルオキシ]エチルホスホリルコリン（Fig.1 中 **BAPPC1**）の合成を行った．**BAPPC1** はフェノキシ基の *p*-位に高い反応性を持つアミノ基を有することで **DAPC** に比べ優れた重合反応性を期待できる．一方，主鎖と PC 基をつなぐスペーサー部に柔軟鎖を導入することで，PC 基が膜表面に局在化しやすくなり血小板の粘着が抑制されることが我々の過去の研究で見出されている[12)]．そこで，スペーサー部にトリエチレンオキシド鎖を導入し，更なる血液適合性の向上を目的としたモノマー設計も行った．ここでは **BAPPC** の合成法とそれを用いた高分子量のポリアミドの合成について述べる．さらに，得られたポリマーの性質として耐溶媒性，表面特性，血液適合性，耐熱性について評価検討したので報告する．



DAPC　　BAPPC1

Figure 1 Chemical structures of diamine monomers containing PC group.

2．実　験

2.1　ホスホリルコリン基含有ジアミンモノマー(**BAPPC**)の合成

2.1.1　試薬

乾燥テトラヒドロフランと乾燥トリエチルアミンは市販のテトラヒドロフラン（安定剤含有）とトリエチルアミンに脱水剤として金属ナトリウム，水素化カルシウムをそれぞれ加え，蒸留することにより得た．2,2-ビス[4-(アミノフェノキシ)フェニル] プロパン（**DA**）は以前の論文[11)]に従って合成した．他の試薬は市販品をそのまま用いた．

2.1.2　3,5-ジヒドロキシ安息香酸メチル(**1**)の合成

アルゴン雰囲気下，ナスフラスコ中に 3,5-ジヒドロキシ安息香酸(10.0 g, 64.9 mmol)とメタノール(100 mL)，濃硫酸(3.33 mL)を混合し 18 時間還流して反応させた．反応後，反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて中性とし，エバポレーターにて濃縮した．この溶液を蒸留水と多量の酢酸エチルで抽出した有機相を回収し無水硫酸ナトリウムで脱水，ろ別した後，減圧下で溶媒を溜去した．その後熱真空乾燥させ，3,5-ジヒドロキシ安息香酸メチルを白色固体として得た．

収量：10.0 g　収率：92.7 %

IR, ν (KBr, cm^{-1})：3250 (O-H), 3090 (C-H), 1692 (Ar-COO), 1599 (C-H), 1443 (O-CH_3), 1163, 1103, 997, 908,767.

^{1}H-NMR, δ (400 MHz, DMSO-*d*$_6$, ppm): 3.80 (3H, s, -$COOCH_3$), 6.44 (1H, t, *J*=2.4 Hz, -Ph-), 6.83 (2H, d, *J*=2.4 Hz, -Ph-), 9.53 (2H, s, -OH).

2.1.3　3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)安息香酸メチル(**2**)の合成

アルゴン雰囲気下、ナスフラスコ内にて化合物 **1** (5.00 g, 29.7 mmol)をジメチルアセトアミド(50mL)に溶解し，得られた溶液に 4-フルオロニトロベンゼン（8.39 g, 59.5 mmol）と炭酸カリウム（8.22 g, 59.5 mmol）を加え，85℃で 5 時間反応させた．反応終了後，溶液を過剰の蒸留水に注ぎ込み，析出した沈殿物を吸引ろ過し，熱真空乾燥させ，3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)安息香酸メチルを白色固体として得た．

収量：10.4 g　収率：85.4 %

IR, ν (KBr, cm^{-1})：3120, 3082, 1709 (C=O), 1604, 1582, 1520, 1508, 1489 (NO_2), 1441, 1352 (-NO_2), 1308, 1232, 1220 (C-O-C), 1167, 1126, 1105, 1005, 993, 851, 773, 750.

^{1}H-NMR, δ (400 MHz, DMSO-*d*$_6$, ppm): 3.85 (3H, s, -$COOCH_3$), 7.20-7.27 (5H, m, -Ph-), 7.53 (2H, d, *J*=2.4 Hz, -Ph-), 8.28 (4H, d, *J*=9.3 Hz, -Ph-).

2.1.4　3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)安息香酸(**3**)の合成

ナスフラスコ中にて化合物 **2**（10.4 g, 25.4 mmol），酢酸（75 mL），濃硫酸（30 mL），および蒸留水（20 mL）を混合し，120℃で 6 時間反応させた．反応終了後，溶液を過剰の蒸留水に注ぎ込み，生じた沈殿物を吸引ろ過し，熱真空乾燥させることで 3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)安息香酸を白色固体として得た．

収量：9.28 g　収率：92.3 %

IR, ν (KBr, cm^{-1})：3110, 3080, 2960 (COOH), 2845, 1693 (C=O), 1578, 1514, 1487 (-NO_2), 1423, 1340 (NO_2), 1305, 1221 (C-O-C), 1170, 1111, 995, 947, 891, 858, 754.

^{1}H-NMR, δ (400 MHz, DMSO-*d*$_6$, ppm): 7.22-7.27 (5H, m, -Ph-), 7.51 (2H, d, *J*=2.4 Hz, -Ph-), 8.28 (4H, d, *J*=9.3 Hz, -Ph-), 12.2 (1H, bs, -COOH).

2.1.5　3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)安息香酸 2-ヒドロキシエチル(**4a**)の合成

アルゴン気流下，三口フラスコ中で化合物 **3**（14.7 g, 37.1 mmol），塩化チオニル（100 mL）およびジメチルホルムアミド（0.2 mL）を混合し，6 時間還流した．その後，常圧蒸留にて塩化チオニルを留去し，白色固体を得た．さらにアルゴン雰囲気下，滴下ロート中で白色固体を乾燥テトラヒドロフラン（130 mL）に溶解させ，エチレングリコール（20.6 mL, 371 mmol），乾燥テトラヒドロフラン（290 mL），乾燥トリエチルアミン（10.3 mL,

74.2 mmol）を三口フラスコ中で混合して得られた溶液に対し，氷水浴中でゆっくり滴下した．滴下終了後，室温で18時間撹拌した．反応溶液を蒸留水で水洗後，クロロホルムで抽出し，硫酸ナトリウムを用いて有機層を脱水した後ろ過し，溶媒を減圧下で留去した．その後，クロロホルムを用いた再結晶により精製し，3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)安息香酸 2-ヒドロキシエチルを白色固体として得た．

収量：9.18 g　収率：56.0 %

IR, ν (KBr, cm^{-1})：3385 (-OH), 3100, 3082, 2985, 2939, 1728 (C=O), 1581, 1489 ($-NO_2$), 1447, 1350 ($-NO_2$), 1300, 1234, 1215 (C-O-C), 1165, 1113, 1076, 968, 895, 851, 750.

^{1}H-NMR, δ (400 MHz, DMSO-d_6, ppm)：3.70 (2H, t, J=4.9 Hz, -$COOCH_2C\underline{H}_2OH$), 4.29 (2H, t, J=4.9 Hz, -$COOC\underline{H}_2CH_2OH$), 4.93 (1H, s, -$COOCH_2CH_2O\underline{H}$), 7.22-7.28 (5H, m, -Ph-), 7.64 (2H, d, J=2.4 Hz, -Ph-), 8.27 (4H, d, J=9.3 Hz, -Ph-).

なお，上記反応においてエチレングリコールの代わりにトリエチレングリコールを用いての反応も行った．精製はシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒；ヘキサン/酢酸エチル＝1:2（体積比））にて行い，8-ヒドロキシ-3.6-ジオキソオクチル-3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)ベンゾエイト（**4b**）を黄色液体として得た．

収率：87.9 %

2.1.6　2-[2-{3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)ベンゾイルオキシ}エチル]-2-オキソ-1,3,2-ジオキサホスホランの合成

アルゴン雰囲気下，化合物 **4a**（9.00 g, 20.4 mmol），乾燥テトラヒドロフラン（110 mL）および乾燥トリエチルアミン（6.50 mL）を三口フラスコ中で混合し，氷水浴中で撹拌しながら 2-クロロ-2-オキソ-1,3,2-ジオキサホスホラン（3.75 mL, 40.9 mmol）をゆっくりと滴下した．滴下終了後，室温で 2 時間撹拌した．反応溶液を蒸留水で水洗後、クロロホルムで抽出し，硫酸ナトリウムを用いて有機層を脱水した後ろ過し，溶媒を減圧下で留去することにより，2-[2-{3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)ベンゾイルオキシ}エチル]-2-オキソ-1,3,2-ジオキサホスホラン（**5a**）を桃色固体として得た．

収量：10.9 g　収率：97.7 %

IR, ν (KBr, cm^{-1})：3120, 3080, 2910, 2874, 1724 (C=O), 1580, 1489 ($-NO_2$), 1443, 1344 ($-NO_2$), 1300, 1235 (P=O), 1209 (C-O-C), 1111, 1032, 999, 968, 860, 750.

^{1}H-NMR, δ (400 MHz, DMSO-d_6, ppm)：4.28-4.39 (6H, m, -CH_2OP-), 4.47 (2H, d, J=4.9 Hz, -$COOC\underline{H}_2CH_2OP$-), 7.24-7.29 (5H, m, -Ph-), 7.60 (2H, d, J=2.4 Hz, -Ph-), 8.28 (4H, d, J=9.3 Hz, -Ph-).

なお，上記反応において化合物 **4a** の代わりに化合物 **4b** を用いての反応も行い 2-[8-{3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)ベンゾイルオキシ}-3,6-ジオキソオクチル]-2-オキソ-1,3,2-ジオキサホスホラン（**5b**）を黄色液体として得た．

収率：94.0 %

2.1.7　2-[3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)ベンゾイルオキシ]エチルホスホリルコリンの合成

アルゴン雰囲気下，化合物 **5a**（10.9 g, 20.0 mmol）をナスフラスコ中で乾燥アセトニトリル（130 mL）に溶解し、氷水浴中でトリメチルアミン（3.54 mL, 39.9 mmol）を加え，容器を密封し 60℃で 18 時間反応させた．その後溶媒を減圧下で留去し，2-[3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)ベンゾイルオキシ]エチルホスホリルコリン（**6a**）を白色固体として得た．

収量：11.3 g　収率：93.1 %

IR, ν (KBr, cm^{-1})：3120, 3080, 2950, 2855, 1719 (C=O), 1580, 1518, 1489 ($-NO_2$), 1445, 1344 ($-NO_2$), 1304, 1238 (P=O), 1211 (C-O-C), 1167, 1078, 999, 968, 860, 750.

^{1}H-NMR, δ (400 MHz, DMSO-d_6, ppm)：3.17 (9H, s, $-N(CH_3)_3$), 3.56 (2H, bt, -$POCH_2C\underline{H}_2N(CH_3)_3$), 4.01 (4H, bt, -$POC\underline{H}_2CH_2N(CH_3)_3$), 4.10 (2H, bt, -$COOCH_2C\underline{H}_2OP$-), 4.42 (2H, bt, -$COOC\underline{H}_2CH_2OP$-), 7.23-7.28 (5H, m, -Ph-), 7.58 (2H, d, J=2.4 Hz, -Ph-), 8.27 (4H, d, J=9.3 Hz, -Ph-).

なお，上記反応において化合物 **5a** の代わりに化合物 **5b** を用いての反応も行い 8-[3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)ベンゾイルオキシ]-3,6-ジオキソオクチルホスホリルコリン（**6b**）を黄色固体として得た．

収率：93.3 %

2.1.8　2-[3,5-ビス(4-アミノフェノキシ)ベンゾイルオキシ]エチルホスホリルコリン（**BAPPC1**）の合成

化合物 **6a**（8.87 g, 14.7 mmol）をナスフラスコ中でメタノール（70 mL）に溶解し，この溶液に 5%パラジウム-カーボン粉末（0.62 g, 0.29 mmol by Pd）を加え，アセトンドライアイス浴で約-78℃に冷却し，系内を水素置換した後，室温に戻して常圧で 18 時間反応させた．セライトを用いて反応溶液をろ過し，減圧下でろ液を 8 割程度留去し，ジエチルエーテルに注ぎ込むと沈殿物を生じた．これを吸引ろ過し，減圧下で乾燥させることで，2-[3,5-ビス(4-アミノフェノキシ)ベンゾイルオキシ]エチルホスホリルコリン（**BAPPC1**）を黄色固体として得た．

収量：7.81 g　収率：97.7 %

IR, ν (KBr, cm^{-1}): 3219 ($-NH_2$), 2972, 2885, 1717 (C=O), 1595, 1506, 1443, 1308, 1240 (P=O), 1209 (C-O-C), 1124, 1086, 1003, 953, 839, 768.

^{1}H-NMR, δ (400 MHz, DMSO-d_6, ppm)：3.15 (9H, s, $-N(CH_3)_3$), 3.33 (4H, bs, NH_2-), 3.52 (2H, bt, -$POCH_2C\underline{H}_2N(CH_3)_3$), 3.94 (4H, bt, -$POC\underline{H}_2CH_2N(CH_3)_3$), 4.06 (4H, bt, -$COOCH_2C\underline{H}_2OP$-), 4.33 (2H, bt, -$COOC\underline{H}_2CH_2OP$-), 6.58-6.63 (5H, m, -Ph-), 6.78 (4H, d, J=8.8 Hz, -Ph-), 7.02 (2H, d, J=2.4 Hz, -Ph-).

なお，上記反応において化合物 **6a** の代わりに化合物 **6b** を用いての反応も行い 8-[3,5-ビス(4-アミノフェノキシ)ベンゾイルオキシ]-3,6-ジオキソオクチルホスホリルコリン（**BAPPC2**）を黄色固体として得た．

収率：84.7 %

2.2 ポリアミド(**PA**)の合成

アルゴン雰囲気下，イソフタル酸クロリド(0.500g, 3.65mmol)と **DA**(1.01g, 3.65mmol)をナスフラスコ内で混合し，この混合物を-78℃に冷却した後，1-メチル-2-メチルピロリドン(2.46 mL)をゆっくりと加え，室温まで昇温してその後 5 時間攪拌した．得られたポリマー溶液を過剰のメタノールに注ぎ込み生成した沈殿を吸引ろ過後熱真空乾燥することでポリアミド(**PA**)を淡褐色固体として得た．

収量：1.26 g　収率：95.0 %

IR, ν (KBr, cm^{-1})：3411 (N-H), 2964 (C-H), 2927, 1654 (C=O), 1604, 1498 (C=C), 1406, 1305, 1230, 1170, 831, 723.

^{1}H-NMR, δ (400 MHz, DMSO-d_6, ppm): 1.64 (6H, s, -C(CH_3)$_2$-), 6.89 (4H, d, J=8.3 Hz, -Ph-), 6.99 (4H, d, J=8.3 Hz, -Ph-), 7.20 (4H, d, J=8.3 Hz, -Ph-), 7.63 (1H, t, J=7.8 Hz, -Ph-), 7.80 (4H, d, J=8.3 Hz, -Ph-), 8.13 (2H, d, J=7.8 Hz, -Ph-), 8.55-8.57 (1H, m, -Ph-), 10.37 (2H, bs, -NHCO-).

2.3 ホスホリルコリン基含有ポリアミド（**CPAPC1a**）の合成

アルゴン雰囲気下，イソフタル酸クロリド（0.500g, 2.46 mmol)，**DA**（0.706 g, 1.72 mmol)，および **BAPPC1**（0.403 g, 0.739 mmol）をナスフラスコ内で混合し，この混合物を-78℃に冷却した後 1-メチル-2-メチルピロリドン（3.28 mL）をゆっくりと加え，室温まで昇温してその後 24 時間攪拌した．得られたポリマー溶液を過剰のメタノールに注ぎ込み生成した沈殿を吸引ろ過後熱真空乾燥することで PC 基含有芳香族ポリアミド **CPAPC1a** を淡黄色固体として得た．

IR, ν (KBr, cm^{-1})：3307 (-NH), 3030, 2970, 2872 (-CH_3), 1725 (C-H), 1654 (C=O), 1604 (-NH), 1498 (C(CH_3)$_2$), 1406 (C-N), 1228 (P=O), 1170, 1080(N-CH_3), 813.

^{1}H-NMR, δ (400 MHz, DMSO-d_6, ppm): 1.65 (s, -C(CH_3)$_2$-), 3.11 (s, -N(CH_3)$_3$), 3.53 (bs, -POCH_2C$\underline{H}_2$N(CH_3)$_3$), 4.01 (bs, -POC$\underline{H}_2$CH_2N(CH_3)$_3$), 4.10 (bs, -COOCH_2C$\underline{H}_2$OP-), 4.36 (bs, -COOC$\underline{H}_2$CH_2OP-), 6.85-6.92 (m, -Ph-), 6.94-7.02 (m, -Ph-), 7.05-7.12 (m, -Ph-), 7.15-7.26 (m, -Ph-), 7.56-7.68 (m, -Ph-), 7.75-7.85 (m, -Ph-), 7.86-7.90 (m, -Ph-), 8.09-8.16 (m, -Ph-), 8.54-8.61 (m, -Ph-), 10.39 (bs, -NHCO-).

上記の重合反応において，**BAPPC1** の代わりに **BAPPC2** を用いて同様な重合を行い，構造の異なるポリアミド **CPAPC2a** を合成した．また，合成時の **DA** と **BAPPC** の組成を変えることにより，PC 基導入率の異なるポリアミド（**CPAPC1b**, **CPAPC1c**, **CPAPC2b**, **CPAPC2c**）を合成した．構造と合成結果の詳細は Scheme 2 および Table 1 に示す．

2.4 キャラクタリゼーション

^{1}H-NMR スペクトルは，日本電子（株）製 NM-TH5SK 400MHz FT-NMR を用いて測定した．赤外吸収（IR）スペクトルは，島津製作所製フーリエ変換赤外分光光度計 FTIR-8400 を用いて測定した．ポリマーの分子量は，東ソー（株）製ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）システム（ポンプ：CCPD, カラム：TSK gels Multipore HXL-M x 5本, カラムオーブン: CO-8010, 示差屈折率計：RI-8010）を用い，N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）を溶媒として分子量の標準物質として標準ポリスチレンを用い測定した．ポリマーの熱物性は，セイコー電子工業（株）TG/DTA-6200, セイコー電子工業（株）DSC-6200 を用いて測定した．ポリマー薄膜上の表面物性はアルバック・ファイ(株)Quantum 2000 X 線光電子分光分析(XPS)装置を用い，入射角 90° にて測定した．

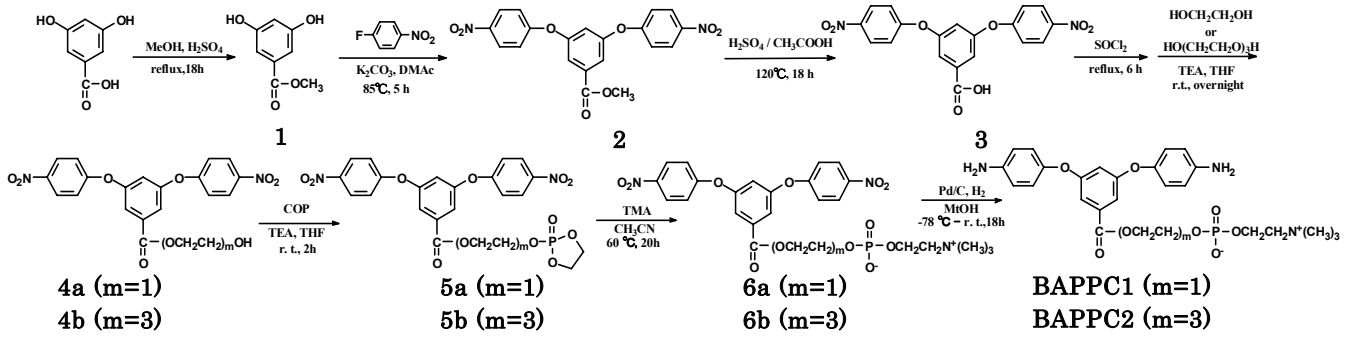
2.5 血液接触試験

得られたポリマーを濃度 0.5 wt%となるようにN－メチルピロリジノンに溶解させポリマー溶液を作製した．これらの溶液に，ポリエチレンテレフタレート（PET）円形基板（直径：14 mm、厚さ：0.2 mm）を浸漬し 60℃にて 2 時間コーティングを行った．この操作を 2 度繰り返し行うことで，PET 基板表面にポリマー薄膜を形成させた．

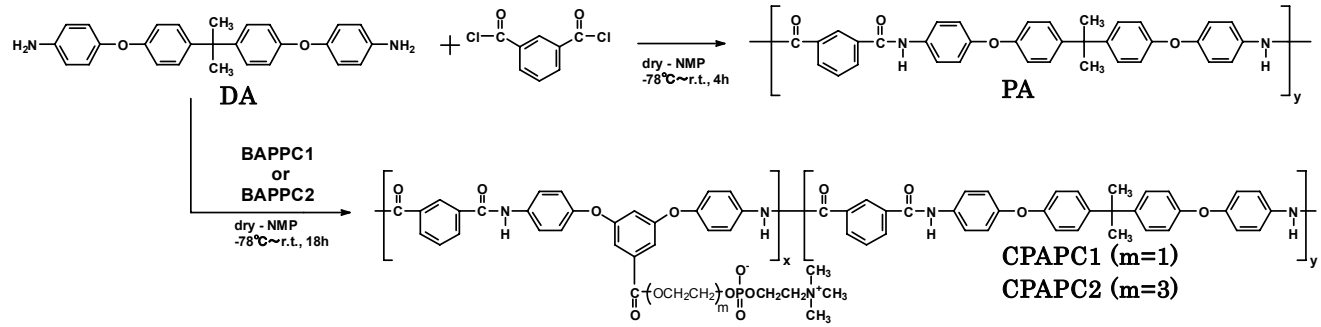
その後この PET 基板をリン酸緩衝溶液（PBS）2ml に 24 時間浸した後，PBS を取り除き，ヒトの血液から採取したヒト血小板多血漿（PRP）および全血 1.0mL を 37℃で 1 時間接触させた．接触後，PBS で 5 回洗浄し，1.0mL のグルタルアルデヒド水溶液にて 2 時間固定化しさらに蒸留水で 5 回洗浄後，一晩凍結乾燥を行った．その後，PET 基板表面を金蒸着し，その表面を走査型電子顕微鏡(SEM、JEOL 製 TSM-5200)で観察した．

2.6 血小板粘着試験

上記と同様の方法でコーティングした PET 基板をリン酸緩衝溶液（PBS）2mL に 24 時間浸した後，PBS を取り除き，ヒトの血液より採取したヒト血小板多血漿(PRP) 400μL に 37℃で 1 時間浸漬した．その後ポリマー薄膜表面を，リン酸緩衝液（PBS）にて 5 回洗浄後，非イオン性界面活性剤であるポリエチレングリコール モノ-p-イソオクチルフェニルエーテル(Triton® X-100)溶液を蒸留水で 0.5wt%に調整した水溶液中に浸漬し 1 時間静置することでポリマー薄膜表面に粘着した PRP を溶液中に脱離させた．得られた溶液に LDH－細胞毒性テスト試薬（LDH-Cytotoxic Test, Wako）を加え，デヒドロゲナーゼ（脱水素酵素）反応させると試薬中の発色成分(ニトロテトラゾリウムブルー)のため溶液が着色される．そこでマイクロプレートリーダー（570 nm）でこの溶液中の吸光度を測定した．さらに，PRP 中の血小板濃度を細胞計数装置（コールターカウンター）（MULTISIZER II, Beckman Counter, CA）で計測し，段階的に希薄したＰＲＰ溶液も同様に吸光度を測定することで検量線を作成した．この検量線に基づきポリマー薄膜上に粘着した血小板量を算出した．



Scheme 1 Preparation of BAPPC monomer.



Scheme 2 Preparation of PA and CPAPC.

Table1 Results of polymerization.

code	composition (mol%) BAPPC/DA	x/y[a)]	Yield (%)	$M_n \times 10^{-4}$ [b)]	M_w/M_n [b)]
PA	0/100	0/100	95.0	49.0	2.34
CPAPC1a	30/70	24/76	91.8	18.2	4.03
CPAPC1b	50/50	46/54	80.9	57.9	2.01
CPAPC1c	70/30	54/46	54.5	59.1	2.05
CPAPC2a	30/70	28/72	97.1	11.3	3.21
CPAPC2b	50/50	45/55	90.0	22.8	3.14
CPAPC2c	70/30	57/43	90.3	24.9	3.31

a) The copolymer composition, x/y, was determined by ^{1}H-NMR.

b) Number-average and weight-average molecular weights (M_n and M_w) were estimated by GPC using DMF as eluent.

3．結果および考察

3.1　ホスホリルコリン基含有ジアミンモノマーとポリアミドの合成

新規 PC 基含有ジアミンモノマー（**BAPPC**）の合成スキームを Scheme 1 に示す．工程は多いものの，いずれの反応も高収率でかつ簡便な精製工程で行うことができた．**BAPPC** の構造は ^{1}H-NMR および IR により確認した．**BAPPC** は側鎖に PC 基を有する様々な重縮合・重付加系ポリマーの合成に役立つと期待できる．

PC 基含有芳香族ポリアミド（**CPAPC**）の合成は Scheme 2 に示すように，**BAPPC** とイソフタル酸クロリド，そして 2,2-ビス[4-(アミノフェノキシ)フェニル] プロパン（**DA**）を用いた重縮合反応により行った．コモノマーとして **DA** を選んだ理由は様々な溶媒に可溶なポリマーを作るためである．一方で **BAPPC** を用いずに **DA** とイソフタル酸クロリドだけで重合したポリアミド（**PA**）は，**CPAPC** との物性や血液適合性の違いを比較するために合成した．

Table 1 はポリマーの合成結果を示している．^{1}H-NMR より，PC 基のメチル基（N-$(CH_3)_3$, 3.11 ppm）とビスフェノール型ユニットのメチル基（C-$(CH_3)_2$, 1.65 ppm）の面積比から共重合組成を決定した。合成時に **BAPPC1**、**2** の仕込み量を変えることにより，いずれのポリマーも PC 基の組成をコントロールすることができた．また，得られたポリマーの数平均分子量(M_n)はいずれも 10^5 以上であった．このことから **BAPPC** はスペーサーの長さにかかわらず重合において高い反応性を持っており，PC 基含有のポリアミドだけでなく，ポリウレアやポリ（ウレタン-ウレア）、ポリイミドを合成する際にも非常に有用である．

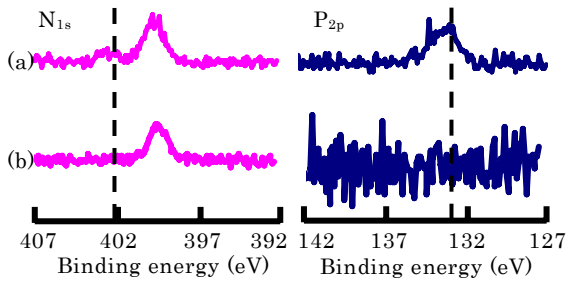


Figure 2 XPS spectra of (a) CPAPC1b and (b) PA film surfaces.

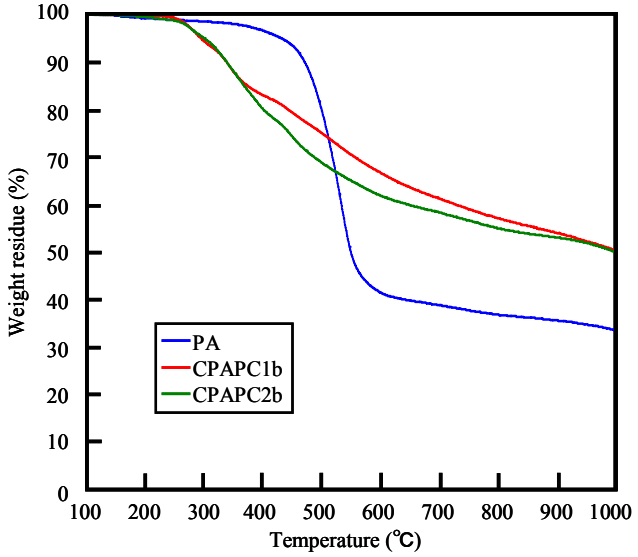


Figure 3 TGA curves of PA and CPAPCs.

3.2 ホスホリルコリン基含有ポリアミドの基礎物性

合成したポリアミドは PC 基の有無にかかわらずいずれも室温で NMP, DMF, DMSO といった非プロトン性極性溶媒に対しては可溶，水やアルコール，他の一般的な有機溶媒に対しては不溶であった．このことより，特定の溶媒に可溶であるため加工成型の際に有利であり，また，水やアルコールのような医療現場で用いられる溶媒に対して耐久性があることがわかった．

CPAPC 膜表面の化学構造を XPS 測定により分析した結果を Figure 2 に示す．ここには **PA** と **CPAPC1b** のスペクトルを示したが，**CPAPC1b** 膜表面からは PC 基の四級アンモニウム（-N^{+}-）とリン酸エステルに由来する窒素（N_{1s}）とリン（P_{2p}）のピークを 402 eV と 133 eV にそれぞれ確認することができた．また他のいずれの **CPAPC** 膜表面からも同様なスペクトルが観測されたことから，**CPAPC** 膜表面には PC 基が存在することがわかった．

3.3 ホスホリルコリン基含有ポリアミドの熱物性

Figure 3 には窒素気流下で測定した **PA**, **CPAPC1b**, および **CPAPC2b** の熱重量分析（TGA）の結果を示した．**PA** の熱重量減少は約 400℃付近から開始したが，**CPAPC1b**, **CPAPC2b** は共に約 250℃付近から開始した．これはポリマー側鎖に存在する PC 基もしくはスペーサー部の分解が主鎖の分解よりも先行するためであると考えられる．PC 基を導入することで分解開始温度が大幅に低下したものの，200℃程度までの耐熱性を有していることが確認できたため，高温蒸気（126℃）にて滅菌される医療材料として用いるには十分な耐熱性であるといえる．

一方，DSC 測定結果から，**PA** および **CPAPC** からは融点（T_m）が観測されなかったためガラス状のポリマーであることがわかった．

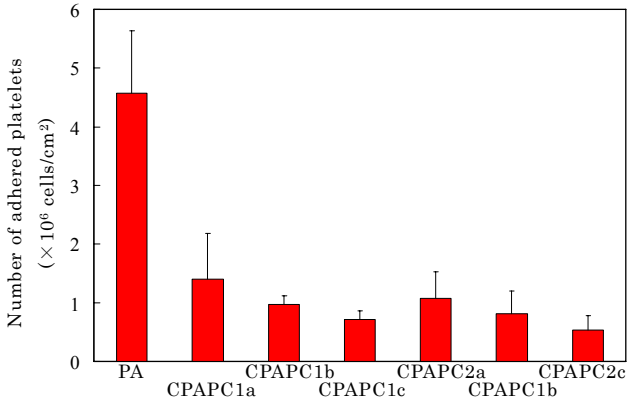


Figure 4 Number of adhered platelets of polymer surfaces after contact with human PRP for 60 min.

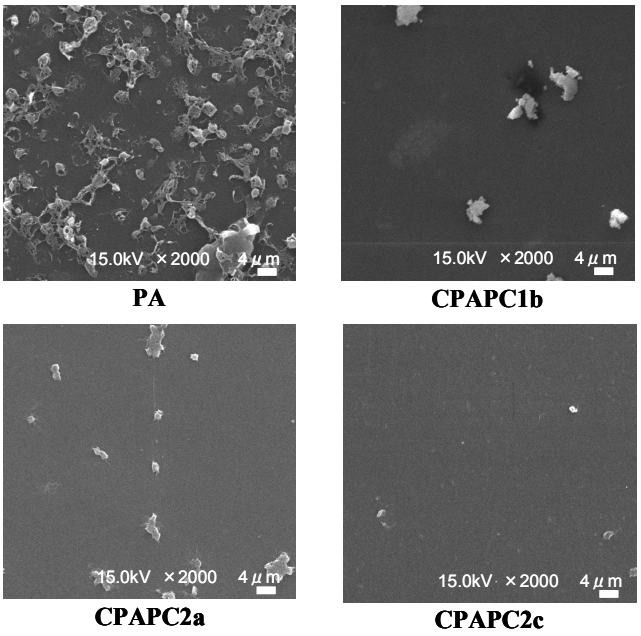


Figure 5 SEM pictures on polymer film surface after contact with human PRP for 60 min.

3.4 ホスホリルコリン基含有ポリアミドの血液適合性

合成したポリマーを PET 基板へコーティングし薄膜を形成させた．その表面にヒト全血を遠心分離（1200rpm, 15 分間）で得られる血小板多血漿（PRP）成分を 37℃で 1 時間接触させ測定を行った．その吸着量の定量結果を Figure 4 に，血小板の吸着したポリマー表面の SEM 写真を Figure 5 に示した．Figure 5 を見ると明らかなように，**PA** は非常に多くの血小板が表面に吸着しており，さらにその形が崩れていることが確認できる．

それに対して, **CPAPC** はいずれも **PA** に比べ血小板の吸着をはるかに抑制していることが Figure 4 からわかる. 特に血小板吸着量の少なかった **CPAPC2c** は **PA** の吸着量の約 6 分の 1 以下という低い値であった. 一方, **CPAPC1** シリーズと **CPAPC2** シリーズを比較すると, いずれの PC 基組成においても **CPAPC2** シリーズが血小板の吸着を抑制していることがわかる. これは以前の研究[12]と同様, スペーサー部の長さや柔軟性に起因すると考えられる. すなわち, 短鎖のエチレンオキシドに比べて長鎖で柔軟なトリエチレンオキシドは運動性が高いため, ポリマーに血液を接触させる前にリン酸緩衝液に 24 時間浸したことで PC 基がポリマー膜表面に局在化したものと推測できる.

4. 結　論

以前の PC 基含有ジアミンモノマー（**DAPC**）の構造を改良し重合反応性を高めた新規なモノマー（**BAPPC**）を合成した. **BAPPC** を用いて合成したポリアミド共重合体（**CPAPC**）はいずれも高分子量体であり, 高収率で得ることができた. また, PC 基仕込み率に対する導入率はほぼ同程度であった. さらに, 得られた共重合体からは強靭な膜が作製できた. **CPAPC** は水やアルコールに対して不溶であるため医療用溶媒への耐久性に優れ, NMP や DMF, DMSO といった特定の有機溶媒に可溶であるため加工しやすいという利点がある. それに加えて, 200℃程度の耐熱性と優れた抗血栓性を有する高機能なポリアミドであるため今後, バイオマテリアルとしての応用が期待できる.

一般に強靭な繊維として幅広く使われているアラミド繊維は芳香族ポリアミドからできている. 今回合成した **CPAPC** も芳香族ポリアミドであるが DSC 結果より結晶構造を有していないことがわかったため, 今後は結晶構造をとるように主鎖構造に改良を加え, 繊維としての応用を検討する予定である.

謝辞：TGA 測定にご協力いただき, 今回の結果に対して多くの助言をいただいた（財）相模中央化学研究所の秋山映一博士に感謝の意を表する. また, 本研究の一部は. 文部科学省平成 15-18 年度科学研究費補助金（基盤研究 C, No. 15550110）の助成を受けて行ったものである.

参考文献

1) K. Ishihara, T. Ueda, N. Nakabayashi: Preparation of Phospholipid Polymers and Their Properties as Polymer Hydrogel Membranes, Polym. J., **22** (1990) 355-360.
2) K. Ishihara: Bioinspired phospholipids polymer biomaterials for making high performance artificial organs, Sci. Tec. Adv. Mater., **1** (2000) 131-138.
3) Sang Ho Ye, J. Watanabe, Y. Iwasaki, K. Ishihara,K. Akiyoshi: High functional hollow fiber membrane modified with phospholipids polymers for a liver assist bioreactor, Biomaterials, **24** (2003) 4143-4152.
4) Jian-Ping Xu, Jian Ji, Wei-Dong Chen, De-Zeng Fan, Yu-Fu Sun, Jia-Cong Shen: Phospholipid Based polymer as drug release coating for cardiovascular device, Euro. Polym. J., **40** (2004) 291-298.
5) N. Morimoto, A. Watanabe, Y. Iwasaki, K. Akiyoshi, K. Ishihara: Nano-scale surface modification of a segmented polyurethane with a phospholipids polymer, Biomaterials, **25** (2004) 5353-5361.
6) Y. Iwasaki, C. Nakagawa, M. Ohtomi, K. Ishihara, K. Akiyoshi: Novel Biodegradable Polyphosphate Cross-Linker for Making Biocompatible Hydrogel, Biomacromolecules, **5** (2004) 1110-1115.
7) Y. Iwasaki, E. Tabata, K. Kurita, K. Akiyoshi: Selective Cell Attachment to a Biomimetic Polymer Surface through the Recognition of Cell-Surface Tags, Bioconjugate Chem., **16** (2005) 567-575.
8) Sang Ho Ye, J. Watanabe, M. Takai, Y. Iwasaki, K. Ishihara: Antifouling blood purification membrane composed of cellulose acetate and phospholipid polymer, Biomaterials, **27** (2006) 1955-1962.
9) Y. Kiritoshi, K. Ishihara: Molecular recognition of alcohol by volume phase transition of cross-linked poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) gel Sci. Tec. Adv. Mater., **4** (2003) 93-98.
10) M. Oku, S. Nakajima, Y. Tadokoro, N. Shimoyamada, Y. Nagase, Y. Iwasaki, K. Ishihara: Preparation and Biocompatibility of Aromatic Polyamides Containing Phosphorylcholine Moiety, Trans. Mater. Res. Soc. Jpn, **30** (4) (2005) 1037-1040.
11) Y. Nagase, M. Oku, Y. Iwasaki, K. Ishihara: Preparations of aromatic diamine monomers and copolyamides containing phosphorylcholine moiety and the biocompatibility of copolyamides, Polym. J., **39** (7) (2007) 712-721.
12) 下山田直矢, 奥正敬, 長瀬裕, 岩崎泰彦, 石原一彦: ホスホリルコリン基含有芳香族ポリアミドの合成と生体適合性, 東海大学紀要工学部, **Vol.46** (2006), No.2, 5-10.