

# 広いpH領域において優れた生体適合性表面を提供する双性イオンポリマー

徳島大学 大学院社会産業理工学研究部  
理工学域 応用化学系 物質機能化学分野  
教授 安澤 幹人

2023年9月12日

# 双性イオン化合物、 その製造方法及び用途

- 【国際出願番号】 PCT/JP2020/044365  
(出願日:2020年11月27日)
- 【優先権データ】 特願2019-215921  
(出願日:2019年11月29日)
- 【出願人】 国立大学法人徳島大学[100%]
- 【発明者】 安澤 幹人      三木 翼  
荒川 幸弘      今田 泰嗣  
松木 均

# I 発明の概要

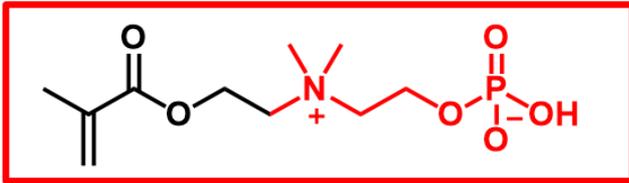
■本発明は、アンモニウム基及びリン酸エステル基を有する新規な分子構造の双性イオン化合物、その製造方法及び用途に関するものである。

この材料により、タンパク質吸着抑制作用が向上した生体適合性材料の提供を可能とした。

## 双性イオン化合物、その製造方法及び用途

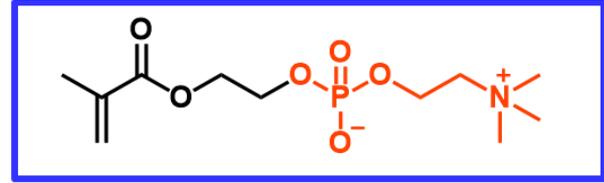
現行モノマーのMPCのPC基において4級アンモニウムカチオン基とホスホジエステル基とを入れ替えた構造(CHP基)を有するモノマー単位を含むポリマー及び生体適合性材料

本発明に用いる双性イオンモノマー例



2-methacryloyloxyethyl choline hydrogen phosphate  
(MCHP)

参考(現行モノマー)



2-methacryloyloxyethyl phosphoryl choline  
(MPC)

【生体適合性材料としての優位性】

・pHが低下しても高い親水性 → 酸性領域を含む広範なpH領域において優れたタンパク質吸着抑制作用



局所的に酸性領域となる部位(ex. 炎症部位、癌発症部位)に対する生体適合性の優位性が期待できる。

# バイオマテリアル(生体適合性材料)の課題

血液と直接接触する医療機器

人工血管    スtent    補助人工心臓    人工肺(ECMO) 等

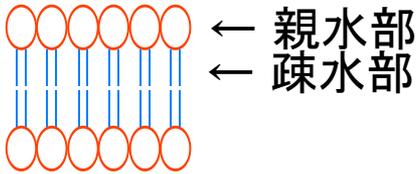


タンパク質吸着抑制の必要性

双性イオン化合物を用いた生体適合性材料

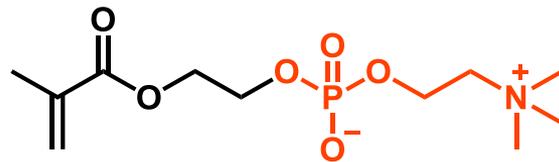
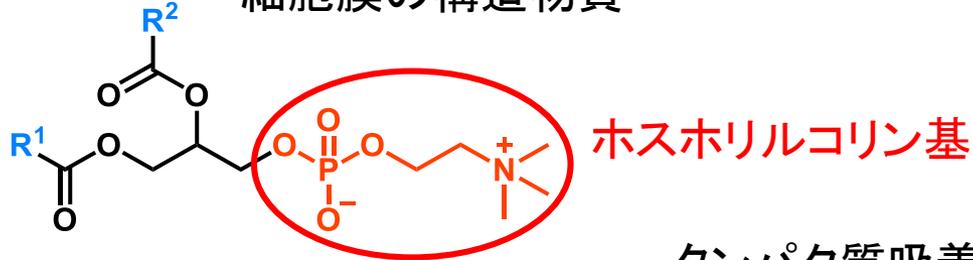
### リン脂質類似双性イオン性モノマーを用いた現行の生体適合性材料

細胞膜



リン脂質二重層

細胞膜の構造物質



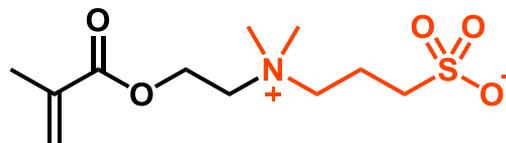
2-methacryloyloxyethyl phosphoryl choline (MPC)

### タンパク質吸着抑制効果

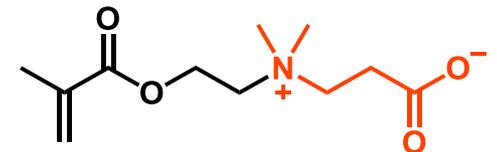
- ・高親水性
- ・電氣的に中性に近い
- ・生分解性が低い
- ・水素結合の供与体でない

日油(株)がMPCを生体適合性素材として事業化(Lipidure®)

その他の双性イオン性モノマー



sulfobetaine methacrylate (SBMA)

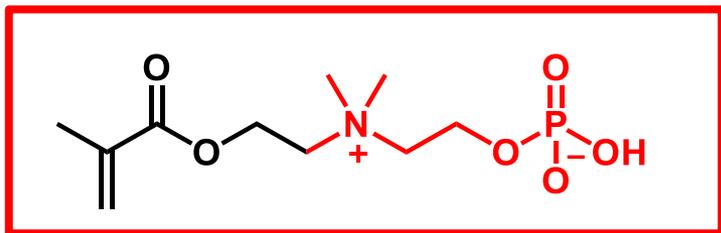


carboxybetaine methacrylate (CBMA)

## 双性イオンモノマー単位から成る新規ポリマー

現行モノマーのMPCのPC基において4級アンモニウムカチオン基とホスホジエステル基とを入れ替えた構造(**CHP基**)を有するモノマー単位を含むポリマー及び生体適合性材料

### 本発明に用いる双性イオン性モノマー一例

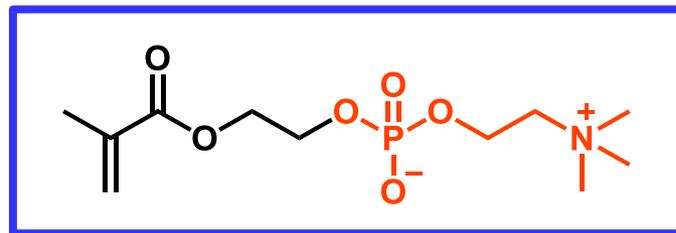


2-methacryloyloxyethyl choline hydrogen phosphate (MCHP)

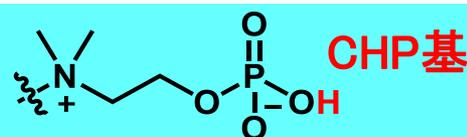
### 【CHP基の特長】

- ・脱離可能なプロトン数の増加
- ・従来の材料と比較して負に帯電
- ・従来の材料とは異なったpH範囲での適用

### 参考(現行モノマー)



2-methacryloyloxyethyl phosphoryl choline (MPC)



Choline Hydrogen Phosphate (CHP)

### 【生体適合性材料としての優位性】

- ・低いpHにおいても高い親水性 → 酸性領域を含む広範なpH領域において正に帯電しにくい



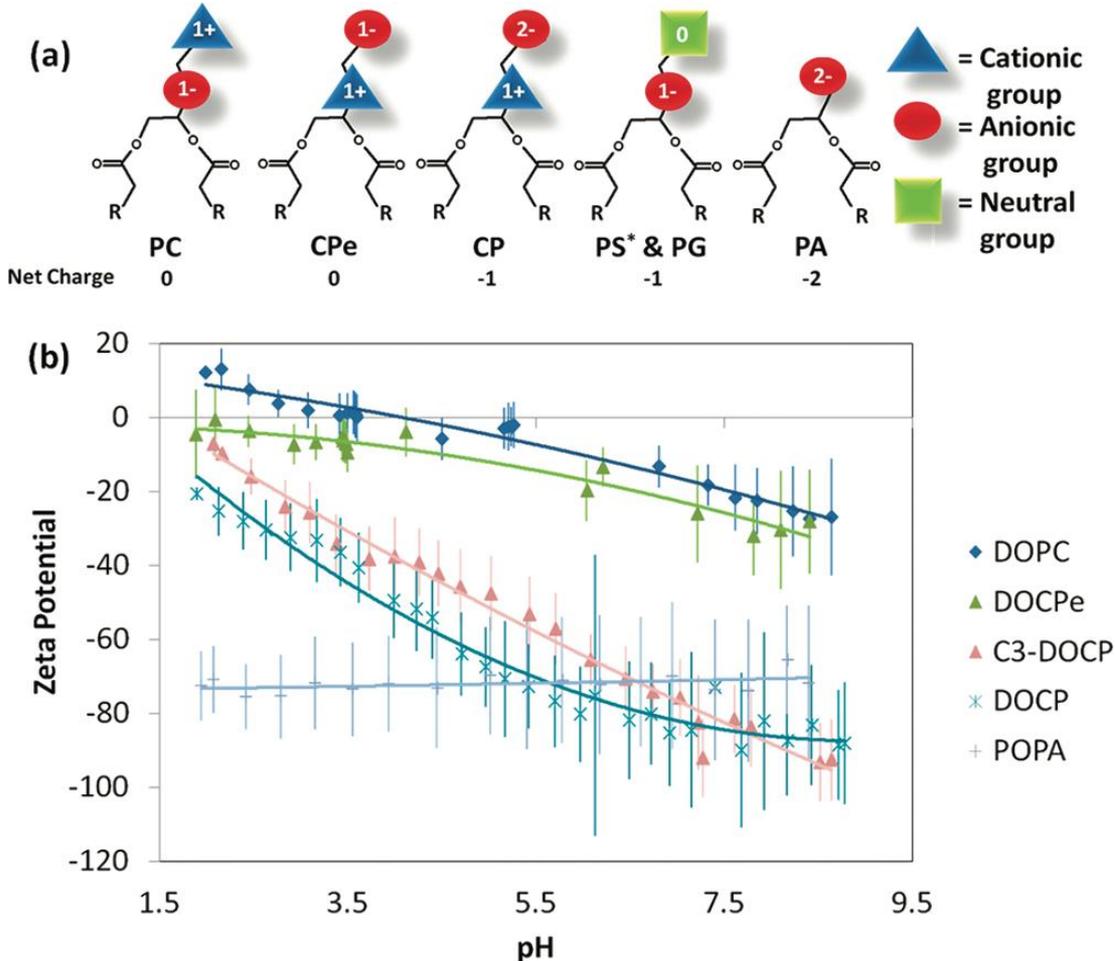
広いpH領域において優れた生体適合性表面を提供し易い

# 従来技術とその問題点

生体適合性材料として医療機器等で活用されている MPC は、pH 3.5 以下の酸性環境下において、正の電荷を持つと思われることから、低い pH では、MPC を用いて得られた表面の特徴である抗血栓性や親水性が低下する傾向がある。

血液全体の pH が、3.5 以下に低下することは考えにくいですが、炎症部位や癌細胞近傍等の局所部位においては、pH 3 以下になることも報告されており、その部位において生成した小さな血栓が、より大きな血栓へと成長することも考えられる。

# 各種極性基のリポソームのゼータ電位と溶液pHの関係



(a) Illustration of the charge orientation and net charge of naturally occurring phospholipid headgroups (PC, PS, PG, PA) and the CP lipid headgroups (CPe and CP). \*The neutral block of the PS headgroup contains a primary amine and carboxylate that are zwitter- neutral at physiological pH. (b) Liposome zeta-potential as a function of solution pH.

MPCの末端基は、pH 3.5以下では、正の電荷を示すが、MCHPの末端基は、pH 2 以下でも、負の電荷を維持する。

## 新技術の特徴・従来技術との比較

本発明の MCHPを用いて得られた表面は、pH 3 の酸性環境下においても負に帯電しており、良好な抗血栓性・親水性を示す。

血液等と常時接触する医療機器の表面においては、広いpH領域において優れた抗血栓性等の生体適合性を有することが望ましく、医療機器の使用寿命の長期化に繋がることが期待される。

また、MCHP は、簡便な3ステップで合成できることから材料のコスト削減が可能と思われ、幅広い用途への応用が期待される。

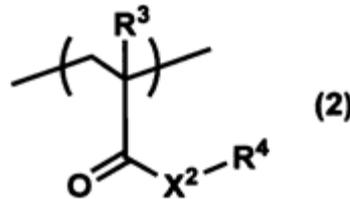
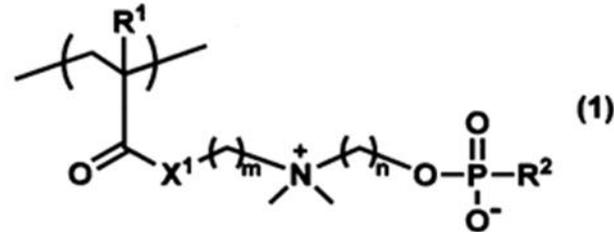
## IV 請求項

### 【請求項1】(独立項)

下記式(1): [式中、R1は、水素原子又はメチル基であり、R2は、OH又はO<sup>-</sup>であり、X1は、-O-又は-N(Q1)-であり、Q1は、水素原子又はC1-6アルキル基であり、mは、1~12の整数であり、nは、1~4の整数である]  
で表される単位を含み、且つ、前記単位の割合が全モノマー単位に対して90モル%を超える、**ポリマー**。

### 【請求項2】(独立項)

下記式(1): [請求項1と同じ]で表される単位、



及び下記式(2):

[式中、R3は、水素原子又はメチル基であり、R4は、C3-16アルキル基であり、X2は、-O-又は-N(Q2)-であり、Q2は、水素原子又はC1-6アルキル基である]で表される単位を含む、**ポリマー**。

### 【請求項3】

式(1)で表される単位と式(2)で表される単位とのモル比が、10:90~40:60である、請求項2に記載の**ポリマー**。

### 【請求項4】

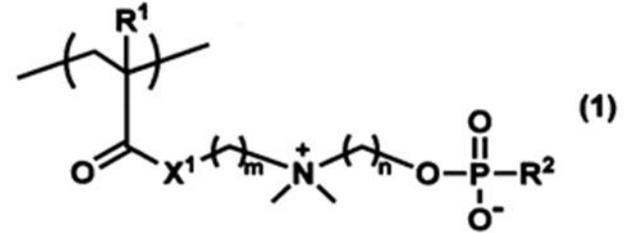
下記式(1):

[請求項1と同じ]で表される単位を含むポリマーを含む**フィルム又はシート**。

## IV 請求項

### 【請求項5】

下記式(1): [請求項1と同じ]  
で表される単位を含むポリマーを含む**生体適合性材料**。

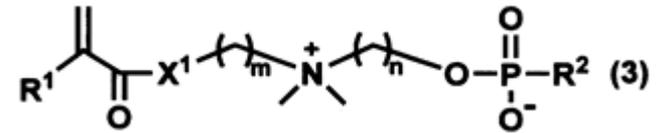


### 【請求項6】

医療材料の表面被覆材である、請求項5に記載の**生体適合性材料**。

### 【請求項7】

基材と、該基材に一端が固定され、他端が自由端である複数のポリマー鎖で形成されたポリマー層とを含むポリマーブラシであって、前記複数のポリマー鎖が、下記式(1): [請求項1と同じ]で表される単位を含むポリマーを含む、**ポリマーブラシ**。

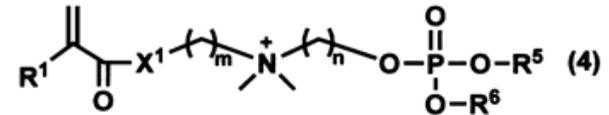


### 【請求項8】(独立項)

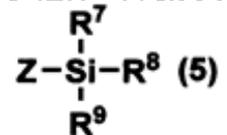
下記式(3):

[式中、R<sup>1</sup>は、水素原子又はメチル基であり、R<sup>2</sup>は、OH又はO<sup>-</sup>であり、X<sup>1</sup>は、-O-又は-N(Q<sup>1</sup>)-であり、Q<sup>1</sup>は、水素原子又はC<sub>1</sub>-6アルキル基であり、mは、1~12の整数であり、nは、1~4の整数である]

で表される化合物の製造方法であって、下記式(4):



(式中、R<sup>5</sup>及びR<sup>6</sup>は、同一又は異なって、アルキル基であり、R<sup>1</sup>、X<sup>1</sup>、m、及びnは前記と同じである)で表される化合物を、下記式(5):

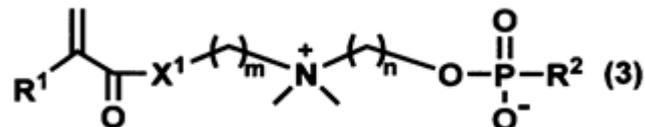


(式中、R<sup>7</sup>~R<sup>9</sup>は、同一又は異なって、アルキル基であり、Zは、ハロゲン原子である)で表される化合物と反応させ、引き続き、水及び/又はアルコールと反応させる工程を含む、**方法**。

## IV 請求項

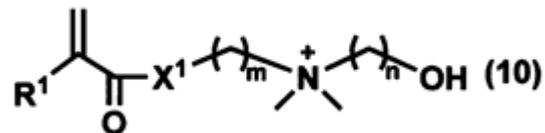
【請求項9】(独立項)

下記式(3):



[式中、R1は、水素原子又はメチル基であり、R2は、OH又はO<sup>-</sup>であり、X1は、-O-又は-N(Q1)-であり、Q1は、水素原子又はC1-6アルキル基であり、mは、1~12の整数であり、nは、1~4の整数である]

で表される化合物の製造方法であって、下記式(10):

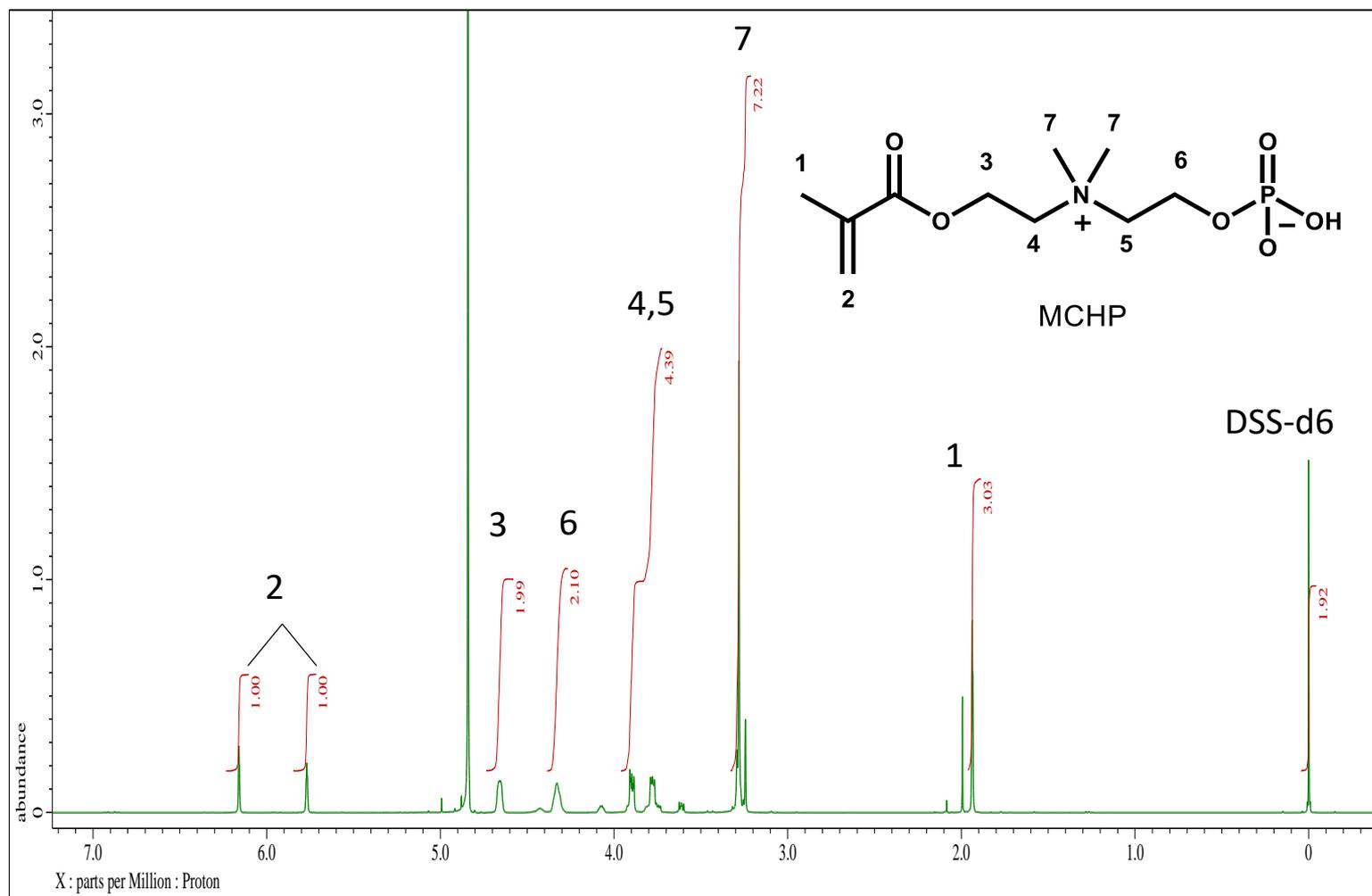


(式中、R1、X1、m、及びnは前記と同じである)

で表される化合物を、POCl<sub>3</sub>又はP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>と反応させ、引き続き、加水分解する工程を含む、**方法**。

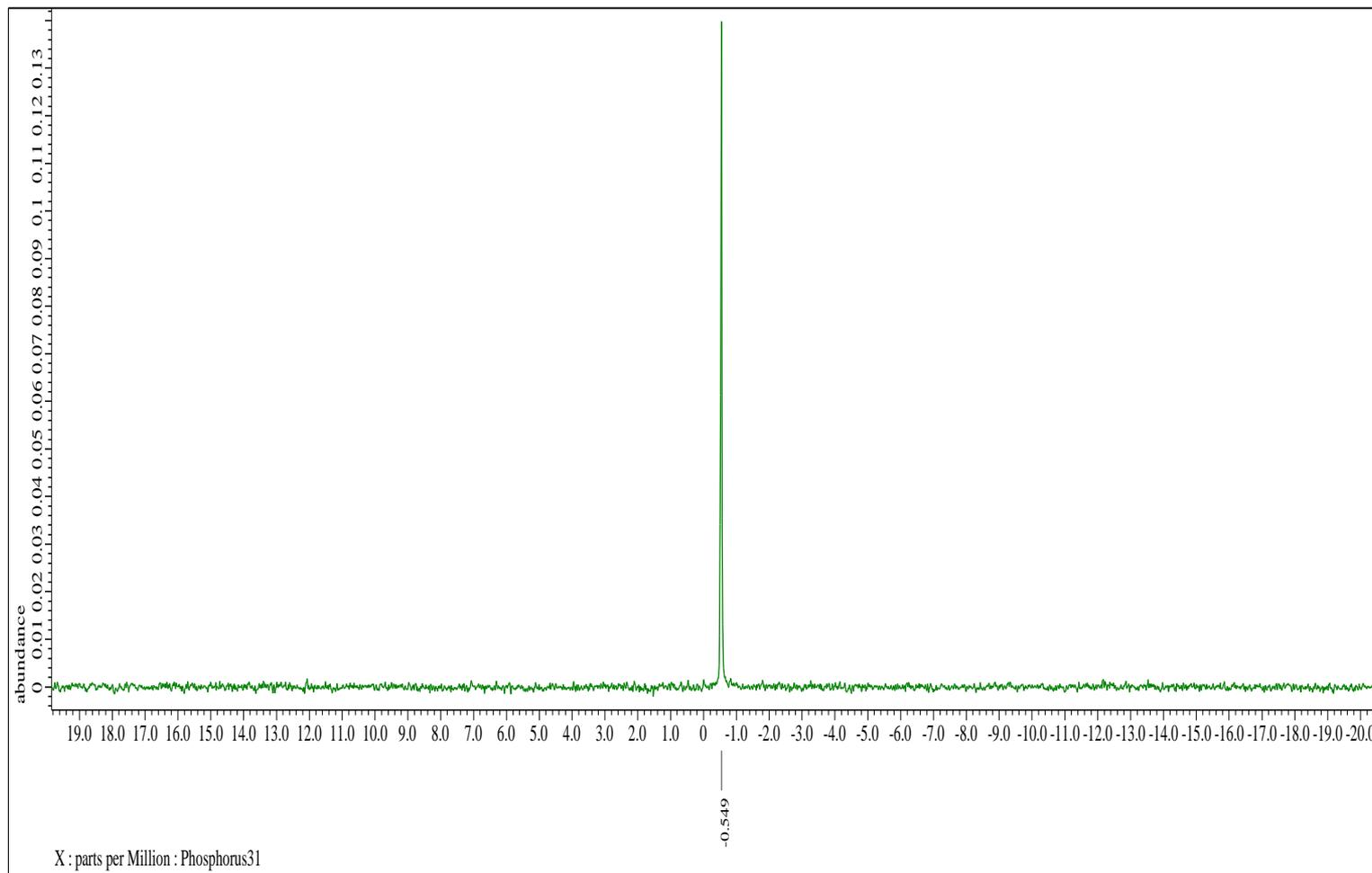
# 構造解析

$^1\text{H-NMR}$  &  $^{31}\text{P-NMR}$  Solvent:  $\text{D}_2\text{O}$  (with  $\text{DSS-d6}$  0.001 g)



# 構造解析

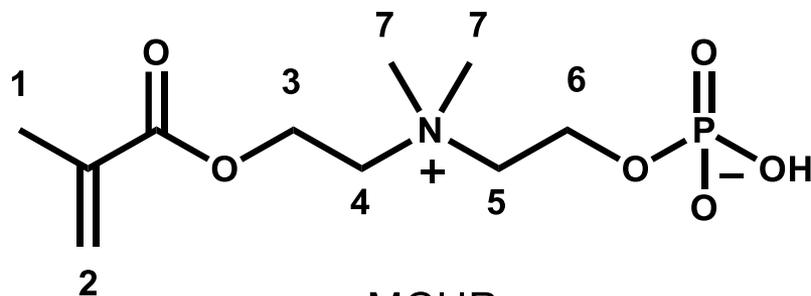
$^1\text{H-NMR}$  &  $^{31}\text{P-NMR}$  Solvent:  $\text{D}_2\text{O}$  (with  $\text{DSS-d6}$  0.001 g)



# 構造解析

$^1\text{H-NMR}$  &  $^{31}\text{P-NMR}$  Solvent:  $\text{D}_2\text{O}$  (with DSS-d6 0.001 g)

$^1\text{H}$ NMR		1	2	3	4, 5	6	7	8	9
MCHP	Shift / ppm	1.9	6.1, 5.7	4.6	3.8, 3.7	4.3	3.2	/	/
	Integration	3.03	1, 1	1.99	4.39	2.10	7.22	/	/
DSS-d6	Shift / ppm	/	/	/	/	/	/	/	-0.1
	Integration	/	/	/	/	/	/	/	1.92

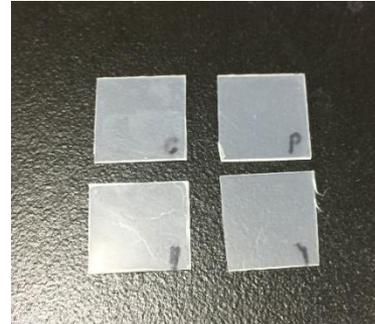


MCHP

# ポリマー溶液を用いた表面修飾

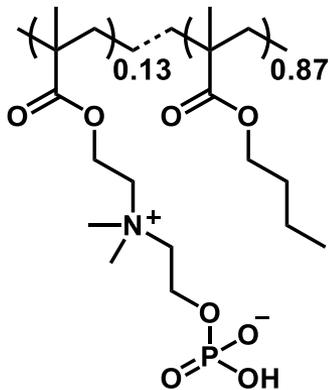


- ・ガラス基板
- ・10 wt%のポリマー溶液
- ・溶媒キャスト法

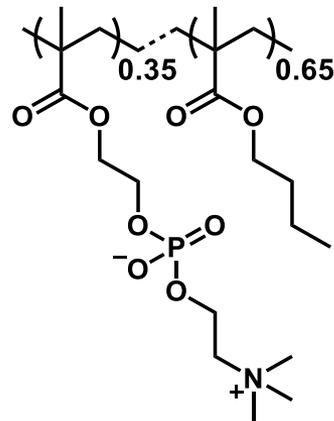


- ・ポリプロピレン基板
- ・0.5 wt%のポリマー溶液
- ・ディップコーティング法

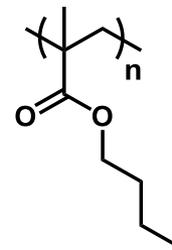
## 用いたポリマー溶液



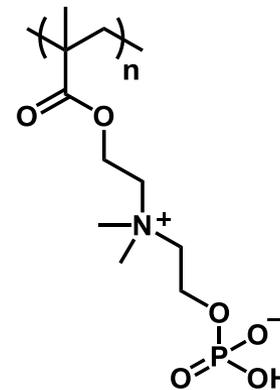
poly(MCHP-co-BMA)  
(ethanol)



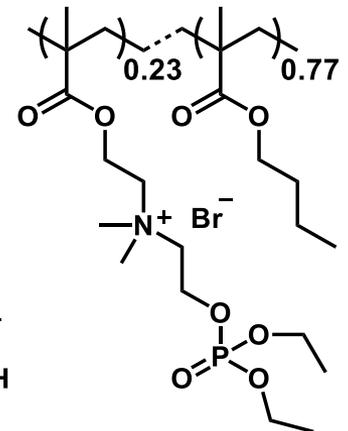
poly(MPC-co-BMA)  
(ethanol)



poly(BMA)  
(acetone)

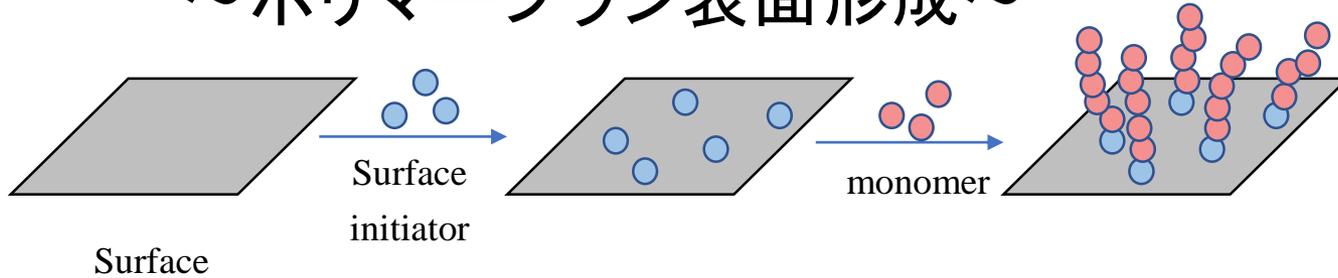


poly(MCHP)  
(water)

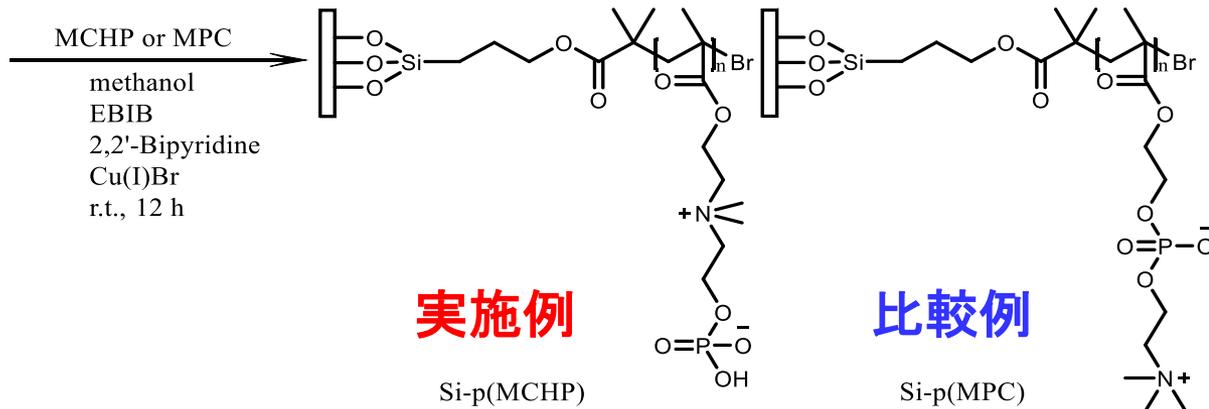
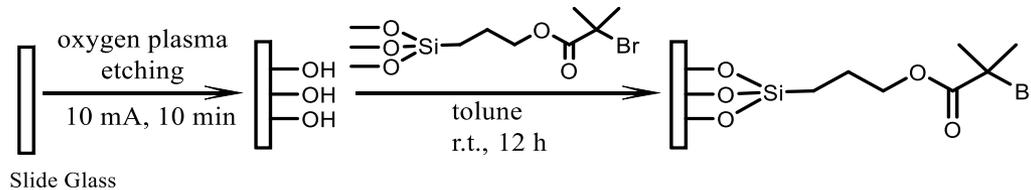


poly(2-co-BMA)  
(ethanol)

# 表面開始原子移動ラジカル重合 (SI-ATRP) を用いた表面修飾 ～ポリマーブラシ表面形成～



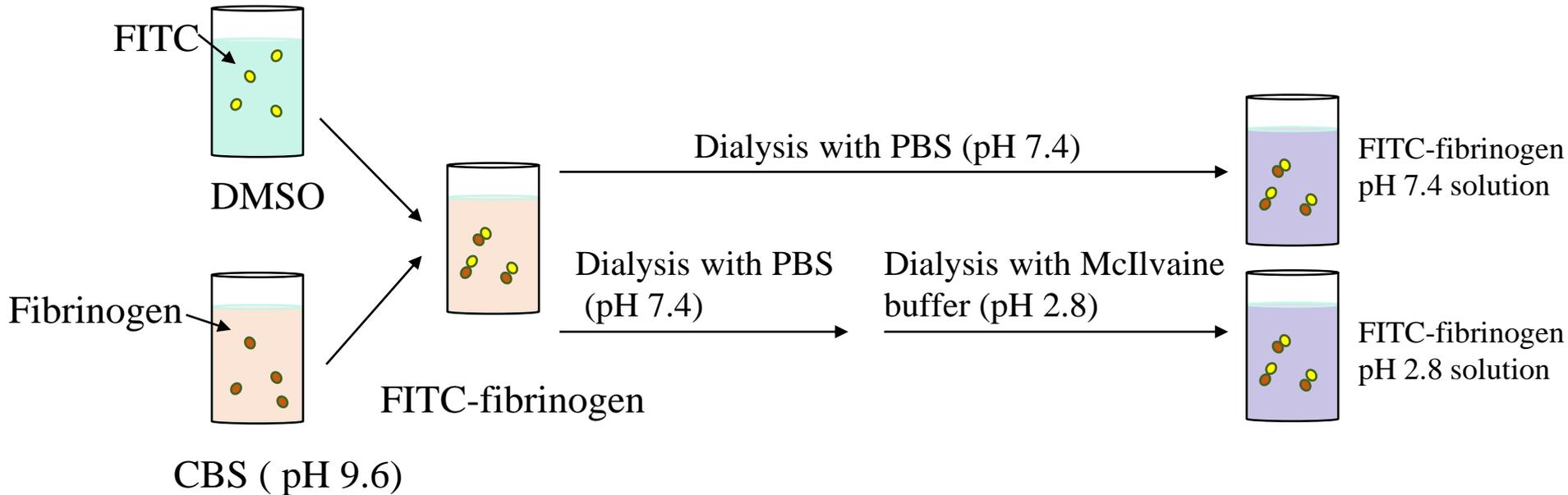
## Surface initiated atom transfer radical polymerization (SI-ATRP)



# 修飾表面の生体適合性の評価 ～タンパク質吸着試験～

## 1. FITC標識フィブリノーゲン緩衝溶液の調製

pH 7.4 vs pH 2.8



## 2. 蛍光顕微鏡及びSEM観察

ポリマー修飾サンプル

incubate in buffer solution (pH 7.4 and 2.8) for 3 h

incubate in FITC-fibrinogen solution for 3 h



Fluorescence Microscope / FE-SEM

## 修飾表面の生体適合性の評価 ～接触角測定～

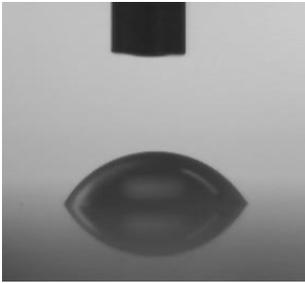
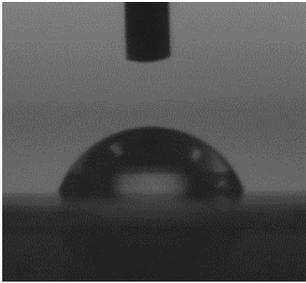
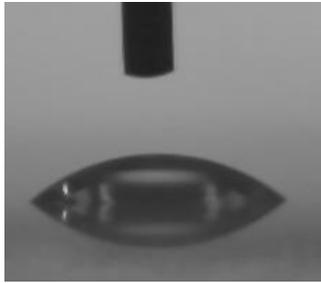
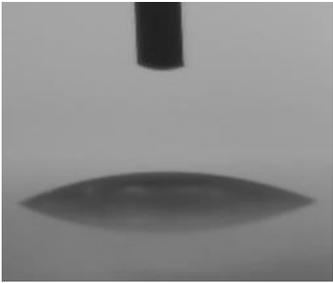
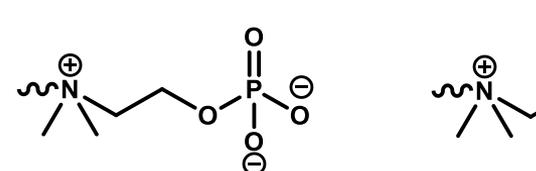
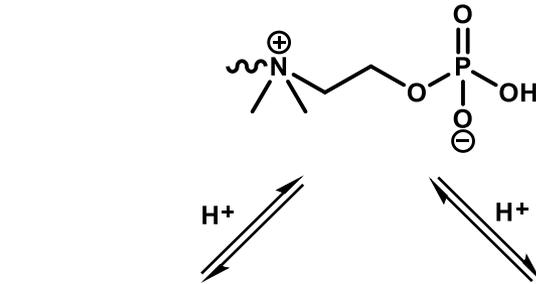
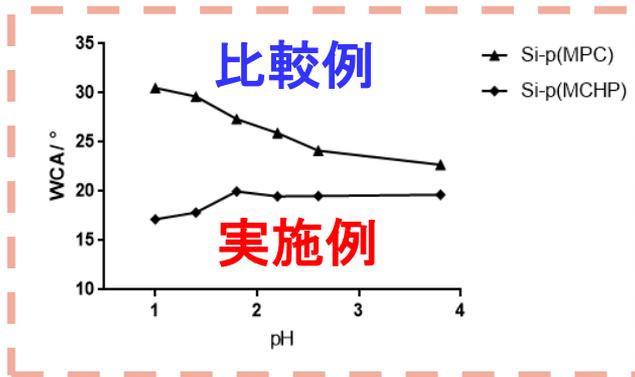
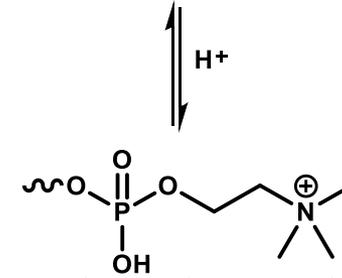
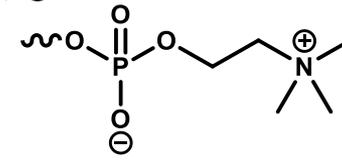
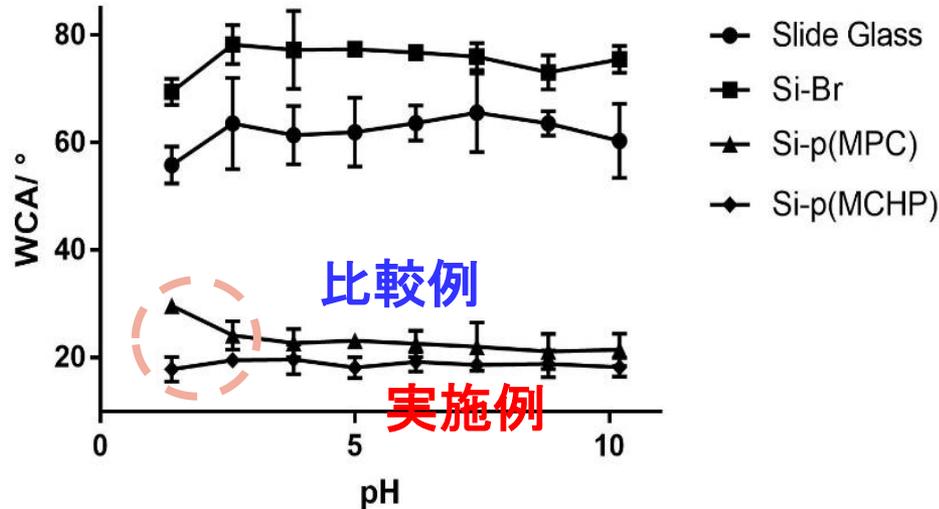
			比較例	実施例
	Slide Glass	Si-Br	Si-p(MPC)	Si-p(MCHP)
WAC	$46.3 \pm 0.4^\circ$	$68.6 \pm 0.9^\circ$	$37.8 \pm 3.6^\circ$	$22.7 \pm 4.3^\circ$
				

図 2 Water contact angle for modified surfaces

スライドガラスの静的な水接触角は、約  $46.3^\circ$  であるのに対し、Si-p(MPC) 及び Si-p(MCHP) は、スライドガラスよりも親水性であり、静的な水接触角は、それぞれ、約  $37.8^\circ$  及び  $22.7^\circ$  であった。このことから、Si-p(MCHP) は、高い親水性表面が形成されることが分かる。

# 修飾表面の生体適合性の評価

～pH と 対水接触角～



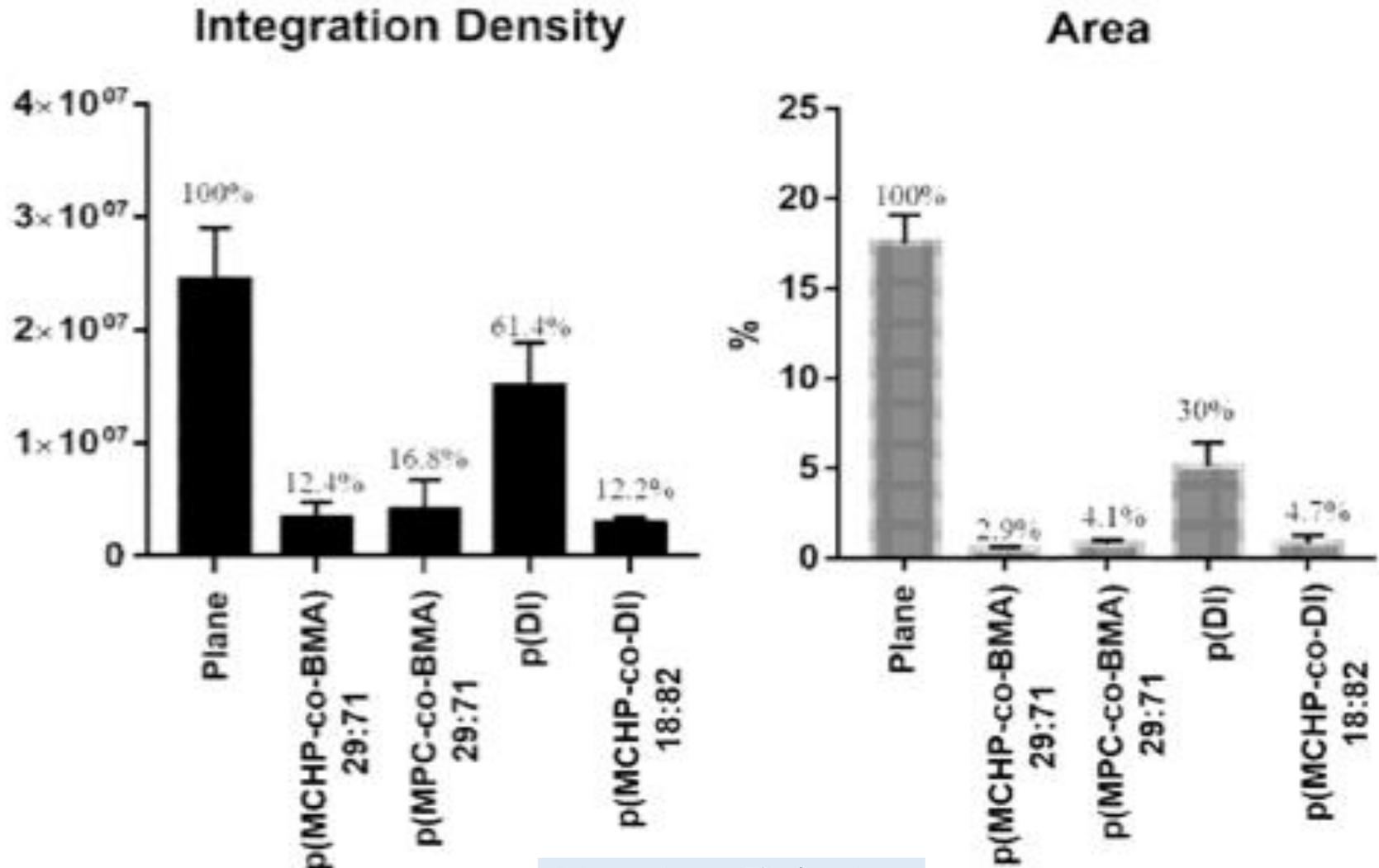
修飾表面の酸性領域における対水接触角変化

Deprotonation and protonation of MCHP

Si-p(MCHP) は、スライドガラス、及び Si-p(MPC) に比べて、より親水性であり、広いpH域において安定であることが分かる。例えば、pH が 3.8 から 1.0 に低下するにつれて、Si-p(MPC) は、対水接触角が大きく変化(上昇)するのに対し、Si-p(MCHP) は、接触角がほとんど変化しない。

# 修飾表面の生体適合性の評価 ～ポリマー溶液を用いた表面修飾～

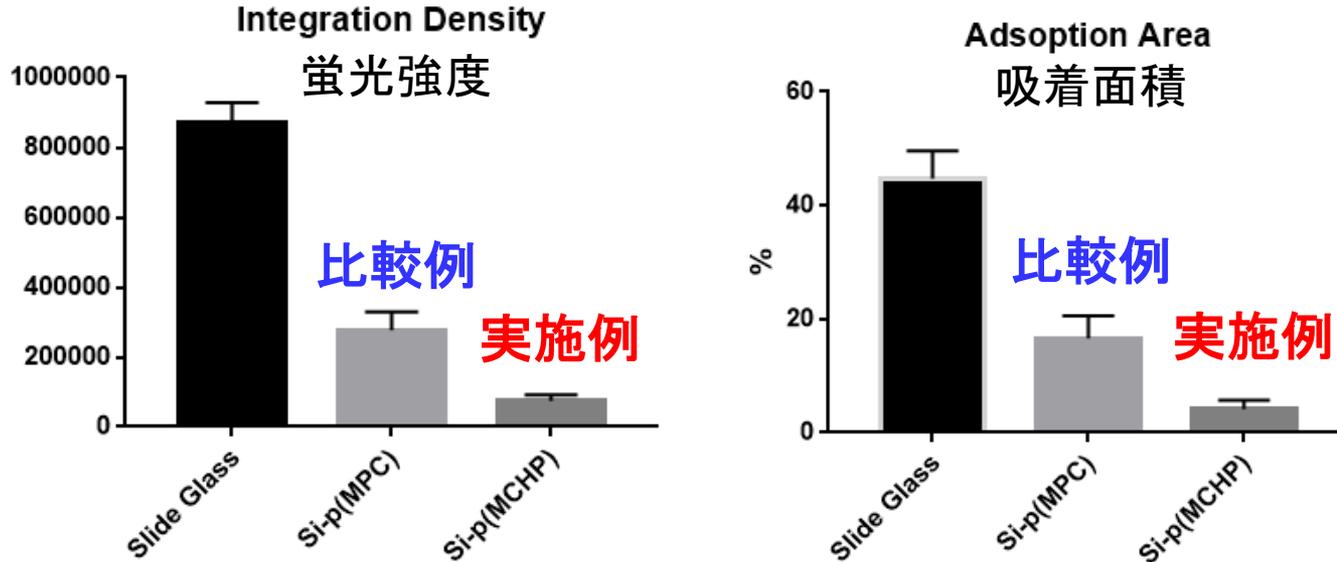
## 蛍光顕微鏡解析結果



DI：イタコン酸ジメチル

# 修飾表面の生体適合性の評価 ～ポリマーブラシ表面修飾～

## 蛍光顕微鏡解析結果



Fluorescence microscopy analysis for modified surfaces

**Integration density:** Sums all of the pixels within a region and gives a total value.

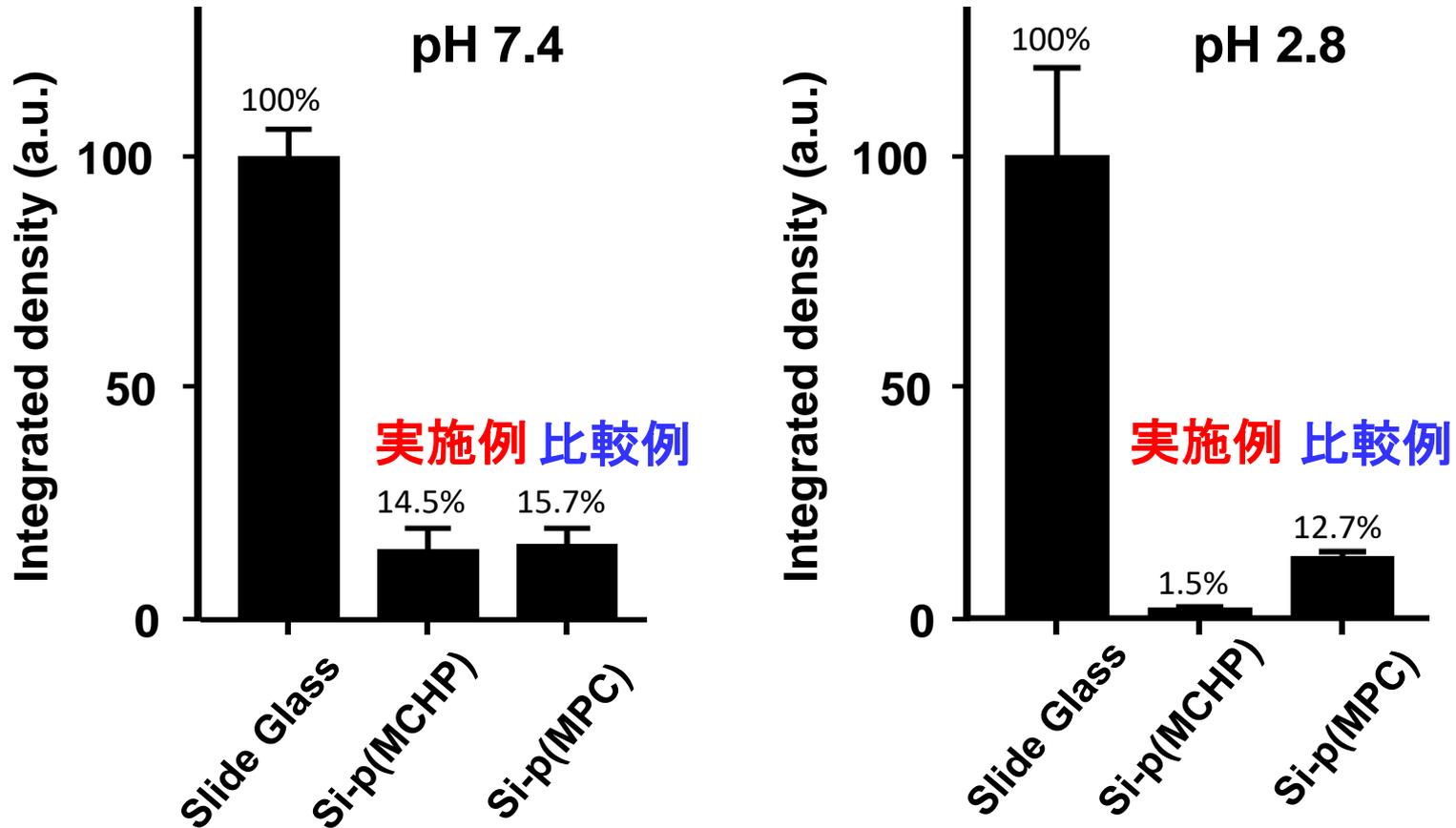
**Adsorption area:** The percentage of the fluorescence section in total area.

スライドガラス上のタンパク質の吸着量は、Si-p(MCHP) 及び Si-p(MPC) に比べて著しく多い。また、スライドガラス上のタンパク質の吸着面積も、Si-p(MCHP) 及び Si-p(MPC) に比べて著しく大きい。Si-p(MCHP) は、タンパク質の吸着量が最も少なく、吸着面積も約5%と低いことが分かる。

# 修飾表面の生体適合性の評価 ～ポリマーブラシ表面修飾～

蛍光顕微鏡解析結果

pHの影響



Fluorescence microscopy analysis for modified surfaces

Si-p(MCHP) は、酸性域においてもタンパク質の吸着抑制効果が高い

## 想定される用途

- 生体適合性（生体親和性、抗血栓性）が求められる医療機器（ステント、補助人工心臓等）
- 手術器具の可動部など血液の付着・凝固の防止
- 保水性（親水性）が求められる材料（コンタクトレンズ、点眼剤、化粧品、細胞培養培地等）
- タンパク質の吸着（非特異吸着）抑制が求められるアフィニティバイオセンサ（抗原抗体反応を活用した診断薬等）

# 実用化に向けた課題

- 現在、ステンレス(SUS316L)やニッケルチタン合金(ニチノール)の表面をMCHPのポリマーを用いて修飾することにより、良好な抗血栓性を示すことが確認された。しかし、MCHPのポリマーを修飾したステントの血管内留置は実施できていない。
- 純度の非常に高いMCHPモノマーの合成が容易であり、製造コストも低く抑えられると考えているが、スケールアップ技術の検証は、不十分である。
- 分子構造を考慮すると安全性の高い材料と思われるが、安全性試験は実施できていない。

## 企業への期待

- 医療機器の製造開発を実施している、企業との共同研究を希望。
- また、コンタクトレンズ、診断薬、化粧品を開発中の企業、保水性、親水性、防汚性等の機能導入が有用な製品開発を考えている企業との共同研究を希望。
- MCHPモノマー及びポリマーのサンプル提供が可能。

# お問い合わせ先

徳島大学  
研究支援・産官学連携センター  
知的財産主席研究員  
四国TLO 大山真吾

T E L 088-656-9400

e-mail [ohyama@s-tlo.co.jp](mailto:ohyama@s-tlo.co.jp)