

# ●抗血栓性を有する医療機器用新規アクリル系コーティング材の開発 Development of Novel Blood-Compatible Acrylic Coating Polymers for Medical Devices

谷口 将太  
Shota Taniguchi

Key Word : Blood-compatibility, Medical Device, Coating Agent

## 1 緒言

2020年初頭、COVID-19感染による重症化患者の治療に体外式膜型人工肺 Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) が使用され、連日報道された。ECMOは、血液に酸素を供給し循環させて心臓や肺の機能を代替する機能を有し、肺機能が著しく低下した場合や心臓手術時に用いられる医療機器である<sup>1)~3)</sup>。

ECMOのように機器内部に患者の血液が送り込まれる体外循環装置では、血液と人工材料の接触によって血栓が形成され、身体に悪影響を与える問題がある。この問題を解決するために、血液に異物と判断されない材料をコーティングする手法が用いられる<sup>4), 5)</sup>。コーティング材には、血液凝固因子である血小板やフィブリノーゲンに対して抗吸着性をもつ抗血栓性材料が使用されており、これにより血栓形成(異物反応)が抑制される。

このような抗血栓性材料には、一般に動物由来の高分子(ポリマー)であるヘパリンが用いられる。しかし、動物由来であるため、感染のリスクや供給不安などの問題がある。この問題に対して、抗血栓性に優れた合成ポリマーの検討がされている。例えば、双性イオン型の側鎖構造を有するポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)(PMPC)(Fig.1)が挙げられる。これは、細胞脂質膜と類似の化学構造のため、極めて抗血栓性が高い。しかし、PMPCは、水溶性であるため、そのままでは血液との接触によって体内に溶出してしまふ。そのため、抗血栓性のないブチルメタクリレートなどの疎水性モノマーとの共重合により非水溶化させたポリマーを使用するが、安定した抗血栓性が得られない問題がある。

一方、非水溶性合成ポリマーであるポリ(2-メトキシエチルアクリレート)(PMEA)(Fig.1)が実用化されている。これは、単純な化学構造にもかかわらず抗血栓性に優れており、また非水溶性のため血液に溶出せず、簡便な物理コーティン

グが可能である。しかし、長時間の使用では血栓が生じるケースがあり、改善が望まれている。

このようなポリマー材料がもつ抗血栓性には、その含水状態における水和水が寄与する。水和水は、その構造や運動性により自由水、中間水、不凍水の3種類に分類され、このうち中間水が抗血栓性に寄与する<sup>6)~8)</sup>。中間水を含むポリマーは、血小板やフィブリノーゲンに対して、材料表面上の中間水が緩衝材として機能し、その斥力により材料との接触および吸着を防ぐ<sup>9)</sup>。

本研究では、側鎖にウレタン結合もしくはウレア結合を有する(メタ)アクリレートに着目し、様々なウレタンアクリレートポリマーおよびウレア(メタ)アクリレートポリマーを合成した。これらポリマーの中間水の定量から、本用途に最適なポリマーの化学構造を探索し、実用性を考慮して非水溶性かつ抗血栓性に優れた新規ポリマーの開発を行った。

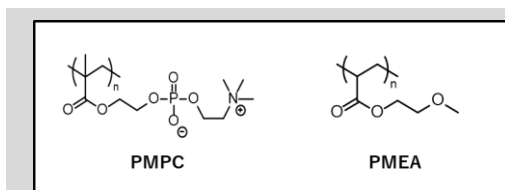


Fig. 1 抗血栓性を有する合成ポリマーの例

## 2 実験

### (1)モノマーの合成

Urethane-1 (Fig.2) モノマーの合成例を示す。

300 mLの3口フラスコにテトラヒドロフラン 50 mL、ジブチルスズジラウレート 0.009 g、メタノール 2.64 gを加えた。次に、滴下漏斗に、2-アクリロイルオキシエチルイソシアナート 10.58 gを加えた。

その後、フラスコ内を窒素に置換し、内温を5°C以下まで冷却した。内温を10°C以下に保ちながら、滴下漏斗から2-アクリロイルオキシエチルイソシアナートを滴下した後、室温で一晩反応させた。

東亜合成株式会社 R&D 総合センター 応用研究所

Applied Research Laboratory, General Center of R&D, TOAGOSEI CO., LTD.

反応は、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液を加えることで終了させた。次に、酢酸エチルと純水を用いて分液操作を行い、有機層を回収した。その後、減圧操作により有機層から溶剤を除去し、無色透明の回収物を得た。回収物を、ヘキサン/酢酸エチルを 1:1 の体積比率で混合した溶剤を用いて、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製し、Urethane-1 モノマーを得た。

本稿に記載のウレタンアクリレートポリマーおよびウレア（メタ）アクリレートポリマーのモノマーは、本合成例の手順に従い、合成した。

## (2) ポリマーの合成

本稿に記載のポリマーは、下記 Urethane-1 の例に基づき合成した。また、分子量 5,000 未満の低分子量体および水溶性成分を除去するために再沈殿精製を行った。

2 口試験管に、Urethane-1 モノマー 3 g、2-アゾビス（2,4-ジメチルバレロニトリル）0.272 g、アセトニトリル 12 g を加えた。その後、アルゴンを 100 mL/min で 30 分間試験管内の溶液に吹き込み、脱酸素した。次に、試験管を密閉し、ヒートブロックに試験管を挿入し、内温 60°C で重合を開始した。3 時間経過後、試験管を氷浴で冷却して、重合を停止させた。ヘキサンとアセトンを 3:7 の重量比で混合した溶媒を用いて、反応液の再沈殿精製を 2 回実施した。その後、純水を溶媒として重合体の再沈殿精製を実施し、Urethane-1 を得た。

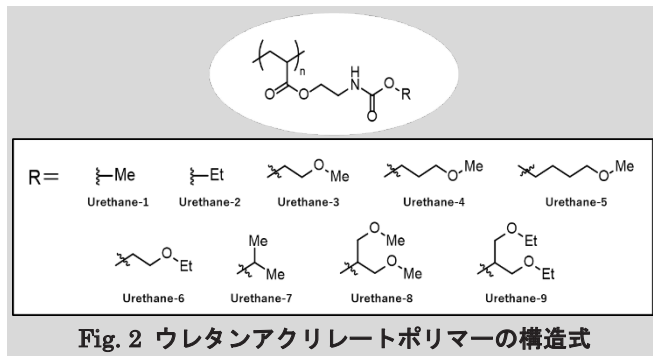


Fig. 2 ウレタンアクリレートポリマーの構造式

## (3) ゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) 測定

合成したポリマーの分子量は、GPC システム（東ソー、HLC-8320GPC）を用いて測定した。測定に用いたカラムは、スチレン・ジビニルベンゼン共重合体（東ソー、TSKgel SuperMultipore HZ-H）、標準物質にはポリスチレンを用いた。また、溶離液は THF とし、流速 0.18ml/min、温度 40°C の条件で測定した。

測定により得られたポリマーの溶出時間から、重量平均分子量 ( $M_w$ ) と数平均分子量 ( $M_n$ ) を算出した。

## (4) 示差走査熱量 (DSC) 測定

DSC 測定は、DSC 機器（NETZSCH、DSC214Polyma）を用いて、昇降温速度 5°C/min にて、40°C から -100°C まで冷却し、-100°C で 5 分間保持した後、40°C まで昇温して実施した。また、乾燥したポリマーのガラス転移温度（乾燥  $T_g$ ）および含水したポリマーのガラス転移温度（含水  $T_g$ ）は、昇温過程における熱転移の中間点として見積もった。

含水ポリマー中の水和水は、DSC 測定により定量した。まず、乾燥させたポリマーを大過剰の純水中に浸漬し、3 日間浸漬した。含水後のポリマー 0.003~0.005 g 程度をアルミパンにそれぞれ秤量し、封止した。封止したサンプルを DSC 測定し、水の結晶形成時の発熱挙動により、中間水、自由水および不凍水に分類し、それぞれ定量を行った。

Fig.3 に、含水した Urethane-3 の DSC 測定により得られたチャートを示した。DSC の降温（冷却）過程において、発熱ピーク温度が、-40°C 付近で観測された水および昇温（加熱）過程で発熱ピークが観測された水を共に「中間水」とした。また、純水と類似の結晶形成挙動を示す水を「自由水」とし、測定温度範囲の下限値である -100°C でも低温結晶形成しない水を「不凍水」とした。

測定後のアルミパンの上蓋にピンホールを開け、110°C で真空乾燥させた。乾燥前後の重量変化量を、ポリマーに含まれていた水和水量とした。

上記で分類した水和水の定量は、下記数式 (1) ~ (3) に従った。

$$\text{(中間水量 : g)} = (\text{中間水のエンタルピー総変化量 : J}) \div (\text{水の融解潜熱 : 334 J/g}) \quad \dots (1)$$

$$\text{(自由水量 : g)} = (\text{自由水のエンタルピー総変化量 : J}) \div (\text{水の融解潜熱 : 334 J/g}) \quad \dots (2)$$

$$\text{(不凍水量 : g)} = (\text{ポリマーの水和水量 : g}) - (\text{中間水量 : g}) - (\text{自由水量 : g}) \quad \dots (3)$$

なお、中間水のエンタルピー総変化量は、降温過程において発熱ピーク温度が -40°C 付近で観測されたピークのピーク面積と、昇温過程において観測された発熱ピークのピーク面積との合計量に基づき算出した。

下記数式 (4) および (5) に従い、秤量値に対する中間水量および不凍水量の各比率を算出した。また、昇温速度 5°C/min の条件で、水の結晶が融解する際の吸熱のピークトップが 0°C 付近になったポリマーの含水状態を、飽和含水状態とした。飽和含水状態における重合体の水和水量を「飽和含水量」と定義して、下記数式 (6) により、秤量値に対する飽和含水量の比率を重量パーセント (wt%) で算出した。

$$\text{(中間水量 : wt\%)} = (\text{中間水量 : g}) \div (\text{含水ポリマー量 : g}) \times 100 \quad \dots (4)$$

$$\text{(不凍水量 : wt\%)} = (\text{不凍水量 : g}) \div (\text{含水ポリマー量 : g}) \times 100 \quad \dots (5)$$

$$(\text{飽和含水量 : wt\%}) = (\text{ポリマーの水和水量 : g}) \div (\text{含水ポリマー量 : g}) \times 100 \quad \dots (6)$$

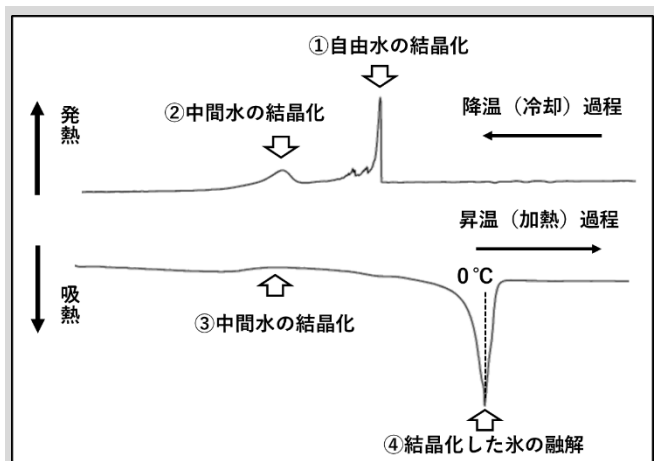


Fig. 3 含水した Urethane-3 の DSC 測定チャート

### (5) フィブリノーゲン吸着試験

各ポリマーの濃度が、0.2 重量体積パーセント (w/v%) になるように溶液を調製した。溶媒はメタノールとし、メタノールに不溶な場合は、酢酸エチルとした。このポリマー溶液 15  $\mu\text{L}$  を、96 ウェルプレート (コーニング、ジェネラルアッセイプレートポリプロピレン製 96 ウェルパーフェクトプレート平底 非滅菌) の各ウェルに滴下し、3 日間静置乾燥した。フィブリノーゲンの濃度が 3 mg/ml になるように PBS (-) (リン酸緩衝生理食塩水 (-)) に溶解させた溶液を 50  $\mu\text{L}$  ずつウェルに加え、その後 37°C で 10 分間静置した。10 分後、内液を除去、PBS (-) を各ウェル 200  $\mu\text{L}$  入れて洗浄し、この洗浄を 7 回繰り返した。乾燥させた後、各ウェルに抽出液 (5% ドデシル硫酸ナトリウム水溶液と 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液を 1 : 1 の体積比率で混合した溶液) を 50  $\mu\text{L}$  加え、37°C で 2 時間静置した。

次に、抽出されたタンパク質を定量するために、抽出液をマイクロ BCA アッセイ (Thermo Scientific、Micro BCA Assay Kit) によって測定した。なお、濃度算出のための標準線は、ウシ血清アルブミン (BSA) を用いて作成した。

なお、本実験は、各ポリマーにつき 5 ウェルで実施し、その吸着量の平均値を算出した。

### (6) 血小板吸着試験

ポリエチレンテレフタレート (PET) シート (サイズ : 5 cm  $\times$  5 cm、厚さ : 125  $\mu\text{m}$ 、三菱ケミカル、DIAFOIL T-100E) をアセトンで十分に洗浄した後、0.2 w/v% のポリマー溶液 650  $\mu\text{L}$  を用いて、PET シート上にスピコートにより塗工した。その後、室温で 3 日間乾燥することで、評価用コーティング基材を得た。なお、各ポリマー溶液につき、基材を 3 枚ずつ作製した。

得られた基材を 8 mm  $\times$  8 mm に切り出し、切り出した基材上に、血小板播種密度を  $4 \times 10^7$  個/cm<sup>2</sup> に調整した血漿液を 200  $\mu\text{L}$  ずつ載せた。37°C で 1 時間静置した後、基材を PBS (-) で 2 回洗浄した。次に、1% グルタルアルデヒドの PBS (-) 溶液に基材を浸漬させ、4°C で一晩静置し、血小板を固定化した。PBS (-) および PBS (-) と水を 1:1 の体積比率で混合した水溶液で洗浄し、最後に純水で洗浄した。なお、各洗浄の前には、対象の洗浄液に基材を 10 分間浸漬させた。

洗浄後の評価用コーティング基材を室温で 3 日間風乾させ、走査型電子顕微鏡 (日本電子、JSM-7900F) を用いて、表面に吸着した血小板数を計測した。計測は、各基材について、5 視野 (倍率 1,500 倍、 $4.8 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>) で行った。1 視野あたりに観測された血小板数を計測し、計測した全 15 視野の平均値を血小板吸着数 (個/視野) とした。

また、吸着した血小板の変性度を観察した。血小板は通常、球形であるが、基材への吸着をきっかけに義足が伸長し、形態が変化する。これは、血液凝固を促進させる働きのため、この変化の度合いから、血栓形成させやすい表面であるかを判断した。本試験では、ネイティブ形態である球形を I 型として、形態の変化度が大きい順に II 型、III 型と分類した<sup>10)</sup>。

## 3 結果と考察

### (1) 合成ポリマーの水和水量の評価

側鎖にウレタン結合を有するウレタンアクリレートポリマーを合成した (Fig.2)。また、これらポリマーの分子量、乾燥  $T_g$ 、含水  $T_g$  および飽和含水時の水和水量を Table 1 に示した。

Table 1 ウレタンアクリレートポリマーのガラス転移温度および水和水量

ポリマー	$M_w$ ( $\times 10^3$ )	$M_w/M_n$	乾燥 $T_g$ [°C]	含水 $T_g$ [°C]	水和水量 [wt%]	自由水量 [wt%]	中間水量 [wt%]	不凍水量 [wt%]
PMEA	84	1.9	-37	-60	8.4	1.3	3.4	3.7
Urethane-1	71	1.8	7	-33	12.0	0.0	4.1	7.9
Urethane-2	100	2.4	2	-20	5.7	0.0	1.1	4.6
Urethane-3	101	2.3	-10	-60	31.5	7.1	12.5	11.9
Urethane-4	276	5.4	-24	-54	17.0	2.0	7.2	7.6
Urethane-5	158	3.7	-29	-54	10.9	0.0	5.2	5.7
Urethane-6	146	3.5	-16	-56	17.8	2.6	6.1	9.1
Urethane-7	93	2.5	18	-8	4.5	0.1	0.9	3.5
Urethane-8	96	2.7	-10	-58	23.4	0.4	14.6	8.4
Urethane-9	105	3.1	-12	-39	6.6	0.4	2.6	4.0

PMEA の側鎖構造と同様のメトキシエチル基を有する Urethane-3 は、PMEA と比較して多くの水和水量を有し、中間水量も多かった。また、メトキシエチル基を 2 つ有する Urethane-8 は、さらに多くの中間水を有していた。

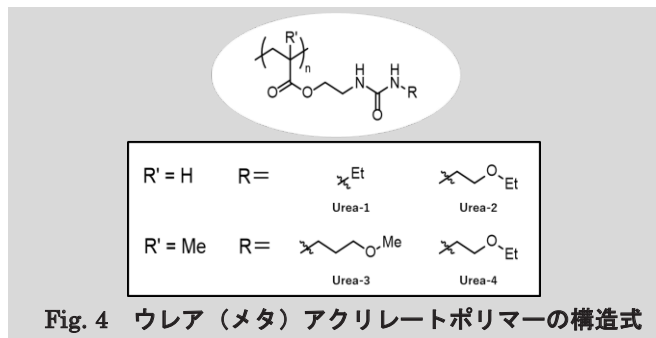
一方、末端がメトキシ基である Urethane-3 および Urethane-8 と比較して、末端がエトキシ基である

Urethane-6 や Urethane-9 は、それぞれ水和水量が少なかった。また、Urethane-3 に対してメトキシ基末端を固定し、鎖中エチレン基を、より炭素数の多いプロピレン、ブチレンとした Urethane-4 と Urethane-5 は、中間水を有するものの、その総量が少なかった。

PMEA と Urethane-3 の水和水量の比較から、ウレタン結合による水和効果の高さが示唆された。ウレタン結合は、カルボニル基を有するため、水分子の水素結合供与をうけることができる。また、NH 結合による水分子へ水素結合の供与も可能である。これにより、ウレタンアクリレートポリマーの水和水量および中間水量が多くなったと推定される。

次に、側鎖にウレア結合を有する(メタ)アクリレートポリマーを合成した(Fig.4)。また、これらポリマーの乾燥  $T_g$ 、含水  $T_g$  および飽和含水時の水和水量を Table 2 に示した。

メトキシ基やエトキシ基を末端に有する Urea-2、Urea-3、Urea-4 は、ウレタン結合をもつ Urethane-3 よりも中間水量が多くなった。これは、ウレア結合が親水性の高い NH 結合を2つ有しているために、ウレタン結合と比べてより強く水分子が水素結合したことによるものと考えられる。



**Table 2 ウレア(メタ)アクリレートポリマーのガラス転移温度および水和水量**

ポリマー	乾燥 $T_g$ [°C]	含水 $T_g$ [°C]	水和水量 [wt%]	自由水量 [wt%]	中間水量 [wt%]	不凍水量 [wt%]
PMEA	-37	-60	8.4	1.3	3.4	3.7
Urea-1	40	N.D.*	26.9	1.2	11.5	14.2
Urea-2	23	N.D.*	34.5	1.2	19.1	14.2
Urea-3	52	N.D.*	38.7	1.0	18.2	19.5
Urea-4	54	N.D.*	38.3	5.4	16.5	16.4

\*N.D.: 明確な  $T_g$  が確認されず

## (2) 抗血栓性評価

抗血栓性は、フィブリノーゲンの吸着量および血小板の粘着数により評価した。なお、フィブリノーゲン吸着試験および血小板粘着試験で得られた未塗工サンプル(PP もしくは PET) と PMEA の結果は、既報の値<sup>10), 11)</sup>と同様の傾向であることを確認した。

### ①フィブリノーゲン吸着量評価

Table 3 に、フィブリノーゲン吸着試験で得られた吸着量と、中間水および不凍水の量を示した。

中間水量が多かったポリマーである Urethane-3、Urethane-8、Urea-2 は、PMEA よりもフィブリノーゲンの吸着量が少なく、その抗吸着性に優れる傾向があった。一方、Urethane-1 は、PMEA より中間水量と飽和含水量ともによく有したが、その吸着量は PMEA より多かった。なお、Urethane-1 は、その中間水/不凍水の比が小さかった。

以上より、不凍水の比率が多くなると、吸着量も多くなる傾向にあることが示唆された。よって、中間水量だけではなく、その全体に対する割合も重要であると推定される。

**Table 3 ポリマーコーティング表面へのフィブリノーゲン吸着量と水和水量**

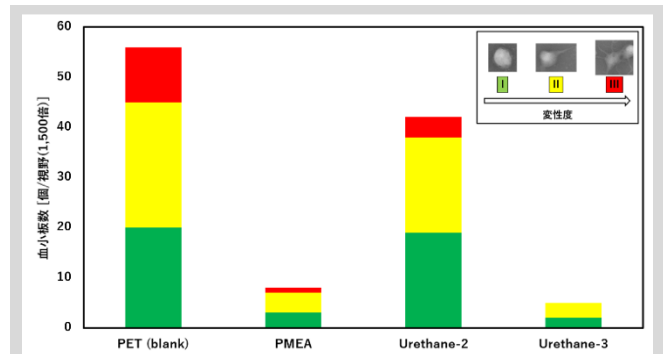
ポリマー	Fib.吸着量 [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]	中間水量 [wt%]	不凍水量 [wt%]	中間水量/不凍水量
PP (blank)	10.9	-	-	-
PMEA	5.6	3.4	3.7	0.92
Urethane-1	12.7	4.1	7.9	0.52
Urethane-2	11.6	1.1	4.6	0.24
Urethane-3	3.0	12.5	11.9	1.05
Urethane-6	6.4	6.1	9.1	0.67
Urethane-8	2.2	14.6	8.4	1.74
Urea-1	6.7	11.5	14.2	0.81
Urea-2	0.1	19.1	14.2	1.35

### ②血小板吸着数評価

Fig.5 に、中間水量および中間水量/不凍水量の大きく異なる Urethane-2 および Urethane-3 の血小板粘着試験の結果を示した。

フィブリノーゲンの吸着量が多かった Urethane-2 では、陰性対照の PET と同様に血小板吸着量が多く、血小板の変性も確認された。一方、フィブリノーゲンの吸着量が少なかった Urethane-3 では、血小板吸着量が少なく、血小板の変性もあまり見られなかった。

以上より、Urethane-3 は、フィブリノーゲン吸着量測定の結果と同様にして、PMEA と同等以上の優れた血小板の抗吸着性を示した。



**Fig. 5 各ポリマー表面への血小板吸着数 (右上図: 変性度の小さい順に I 型、II 型、II 型)**

---

---

## 4 結論

本研究では、Urethane-3 および Urethane-8 (ウレタンアクリレートポリマー) と、Urea-2 (ウレアアクリレートポリマー) という、既存のコート剤である PMEA よりも優れた血液成分への抗吸着性を示す非水溶性材料を開発した。

また、中間水を多く有するポリマーが、高い抗吸着性を示すことが、改めて確認された。このような抗吸着性と化学構造の関係性の知見は、今後の優れた抗血栓性を有する材料開発につながることを期待される。

## 5 謝辞

本研究における中間水測定、フィブリノーゲン吸着試験、血小板吸着試験は、九州大学田中賢教授との共同研究として実施した。測定および解析にあたり、多大なるご協力、ご助言を頂きました同教授ならびに研究室の方々に感謝の意を表す。

## 6 引用文献

- 1) 巽英介, 高分子, **56**, 9, 749-753 (2007).
- 2) 川村慎一, 人工臓器, **42**, 3, 188-190 (2013).
- 3) 片桐伸将, 人工臓器, **48**, 3, 163-167 (2019).
- 4) “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～モノマー (いち) からデザインするバイオインターフェースと上市までの道筋～”, サイエンス&テクノロジー (2014) p.115-385.
- 5) “医療用バイオマテリアルの研究開発”, シーエムシー出版, (2017) p.89-172.
- 6) M. Tanaka, S. Kobayashi, D. Murakami, F. Aratsu, A. Kashiwazaki, T. Hoshida, K. Fukushima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **92**, 2043-2057 (2019)
- 7) 田中賢, 高分子, **68**, 6, 311-315 (2019).
- 8) T. Sonoda, S. Kobayashi, K. Herai, M. Tanaka, *Macromolecules*, **53**, 8570-8580 (2020).
- 9) T. Ueda, D. Murakami, M. Tanaka, *Frontiers in Chemistry: Polymer Surface Chemistry: Biomolecular Engineering and Biointerfaces*, **6**, 542 (2018).
- 10) S. Liu, S. Kobayashi, T. Sonoda, M. Tanaka, *Biomacromolecules*, **22**, 5, 2718 (2021).
- 11) S. Kobayashi, M. Wakui, Y. Iwata, M. Tanaka, *Biomacromolecules*, **18**, 12, 4214-4223 (2017).