

〔原著論文〕

ホスホリルコリン基を有するポリイミドの合成と生体適合性ナノシートの作製

浅尾 幸平*1・荻野 真里*1・岩野 篤*1
岡村 陽介*1・武岡 真司*2・長瀬 裕*1

(受付 2015 年 9 月 7 日・審査終了 2015 年 10 月 14 日)

(早期公開 2015 年 12 月 29 日・DOI:10.1295/koron.2015-0062)

要 旨 ホスホリルコリン(PC)基を含有する芳香族ジアミンモノマー, 1,3-ビス(4-アミノフェノキシ)ベンゼンおよび6FDAから重縮合および化学イミド化によりPC基含有ポリイミド共重合体を合成した。得られたポリマーは, PC基含有率が50 mol%以下でDMSOやNMPなどの極性溶媒に可溶であった。そこで, ポリマー溶液からスピコート法により膜厚が100 nm以下の自己支持性のある超薄膜(ナノシート)を簡便に作製することができた。ナノシートの密着力を測定したところ, 膜厚が薄くなるほど高い密着力を示すことがわかった。さらに, ナノシートを一辺が数十 μm 程度の断片に裁断化して水に分散させることで均一な水分散液を作製することが可能であり, 水を溶媒としたコーティング剤として利用できることを見いだした。また, 得られたPC基含有ポリイミドからなるナノシートで被覆した界面は, 高い抗血栓性を示すことを明らかにした。

1 諸 言

ホスホリルコリン(PC)基は細胞膜の主要構成成分であるリン脂質の極性基すなわち親水部位として, 他の細胞, 細胞外マトリックス, もしくは外部環境との界面を支えている。一方, 合成ポリマーなどの材料表面での血栓形成に至る血液成分の反応は表面に吸着するタンパク質を起点としており, その後起きる血小板細胞の吸着や活性化反応は, リン脂質親水部への吸着タンパク質の接触でなく, 細胞膜表面に存在する膜タンパク質との相互作用が引き金となっている。つまり, PC基は生体内で中性分子として振舞うことで特定のイオンや分子と相互作用せず, 生体成分の接着および吸着に対して不活性である。このような観点から開発された2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーは, 細胞膜表面の類似構造を側鎖に有するポリマーであり, 極めて高い生体適合性を発現することが知られている^{1)~3)}。MPCポリマーにより被覆された材料表面はタンパク質吸着を抑制し, 生体成分に対して温和な相互作用があると報告されている^{4),5)}。よって, MPCポリマーは, 化粧品やコンタクトレンズの洗浄剤などに保湿

性およびタンパク質非吸着性を付与する一成分として実用化されている^{6),7)}。しかしながら, MPCポリマーは主鎖構造がメタクリレートからなるため T_g が低く, 機械的強度や耐熱性の点では材料として問題がある。そこで, MPCポリマーの特性を有効に活用するために, MPCポリマーを機械的強度に優れたポリマーにコーティングあるいはブレンドする手法^{8)~10)}, 表面グラフト化により材料表面を化学修飾する手法^{11),12)}, あるいは光反応性のMPCポリマーを用いた表面修飾^{13),14)}などが盛んに研究されており, バイオマテリアルの分野で実用的な応用展開が多くなされている¹⁵⁾。

一方, 筆者らはこれまでポリアミドやポリウレタンなど T_g の高いポリマーの側鎖にPC基を導入することにより, PC基に由来する高度な生体適合性に加え構造材料としての力学特性を付与した新しいバイオマテリアルの合成を行ってきた。そのために, PC基を含有する新規なジアミンおよびジオールモノマーを合成し, 重縮合や重付加によりポリアミドやポリウレタンとすることで機械的強度や耐熱性, 耐溶剤性を併せもつ生体適合性材料となることを明らかにしてきた^{16)~23)}。得られたPC基含有ポリマー類は, ポリマー中のPC成分の含有量を高めることで優れた生体適合性を発現するものの, それに伴いPC成分と主鎖のアミド結合やウレタン結合などの極性成分との相互作用が強く働いたためポリマーの溶解性が低下し, 高度な生体適合性を示すポリマーはDMFや

*1 東海大学工学研究科工業化学専攻(☎259-1292 平塚市北金目4-1-1)

*2 早稲田大学先進理工学研究科生命医科学専攻(☎162-8480 東京都新宿区若松町2-2)

DMSO, NMP など高沸点の非プロトン系極性溶媒にのみ可溶であった。よって、これらのPC基含有ポリマーのフィルム化やコーティングを行う際にはそれらの毒性の高い高沸点溶媒を使用せざるを得ない。

本研究では、PC基と剛直主鎖を併せもつポリマーとして新たに可溶性ポリイミドの合成を行い、得られたポリマーから厚みが100 nm以下の超薄膜、いわゆるナノシートの作製を試みた。岡村、武岡らは、厚みが数十nmで表面積が cm^2 サイズからなる自己支持性のあるポリマーナノシートの簡便な作製方法を開発し、得られるナノシートは超薄膜ならではの特徴を示し T_g の高いポリマーを使用しても高い柔軟性や密着性を発現することを見いだしている²⁴⁾。さらに、裁断化したナノシートの水分散液は生体に対して安全な薄膜コーティングが可能となるため、医療材料としての応用研究が進められている^{25),26)}。そこで筆者らは、PC基含有ジアミンモノマーから耐熱性、機械的強度に優れた可溶性ポリイミドを合成するとともに、ナノシート化することで剛直なポリマーにおいても高い柔軟性を発現させ、高い密着力を利用してコーティング剤としての応用ができるのではないかと考えた。さらに、ナノシートを裁断化することで水中に分散させ、チューブの外表面や内壁などの他微細な界面へもコーティングできるのではないかと、生体に悪影響を及ぼさない水性のコーティング剤としての用途拡大が期待できるのではないかと考えた。これらの観点から、PC基含有ポリイミドのナノシート化および裁断化ナノシートの作製を行い、その機能およびコーティング能の評価を本研究の目的とした。

2 実 験

2.1 試薬

PC基含有ポリイミド合成のための原料ジアミンモノマーとなる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(BAPPC)は、既報¹⁷⁾に従って合成した。モノマー合成に用いたその他の試薬は市販品をそのまま使用した。また、ナノシート作製に用いたポリビニルアルコール(PVA, 重合度500)およびアルギン酸ナトリウム(Na-Alg, 鹿1級)は、いずれも関東化学(株)にて購入した。コーティング基板および抗血栓性試験に用いたポリエチレンテレフタレート(PET)基板は和光純薬工業(株)製組織培養用プラスチックシート168-09313(14φ)、ポリエチレンチューブはプライムテック(株)製ラウンドチップカテータBC-PE190を用いた。

2.2 コモノマーの合成

2.2.1 3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)ベンゼンの合成

ナスフラスコ内で3,5-ジヒドロキシベンゼン(2.02 g, 18.3 mmol)をジメチルアセトアミド(DMAc, 59 mL)に溶

解させ、4-フルオロニトロベンゼン(5.72 g, 40.5 mmol)と炭酸カリウム(5.56 g, 40.3 mmol)を加え、90°Cで24時間かくはんした。反応後、溶液を過剰の蒸留水に注ぎ込み、生じた沈殿を吸引ろ過した。得られた粉末をメタノールにて洗浄、ろ過、乾燥させたところ、3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)ベンゼン(4.10 g)を白色固体として得た。(収率: 63.4%)

$^1\text{H NMR}$, δ (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 7.10 (2H, m), 7.13 (1H, d, $J=2.5$ Hz), 7.23 (4H, dt, $J=9.5, 2.5$ Hz), 7.60 (1H, t, $J=8.0$ Hz), 8.27 (4H, dt, $J=9.5, 2.5$ Hz).

IR, ν (KBr, cm^{-1}): 3120, 3082, 1709 (C=O), 1604, 1582, 1508, 1489 (-NO₂), 1441, 1352 (-NO₂), 1165, 1126, 1113, 1005, 993, 916, 851, 772, 750.

2.2.2 3,5-ビス(4-アミノフェノキシ)(BAPB)の合成

ナスフラスコ内で2-ヒドロキシエチル-3,5-ビス(4-ニトロフェノキシ)ベンゼン(4.10 g, 1.16 mmol)をメタノール(130 mL)とテトラヒドロフラン(THF, 100 mL)の混合溶媒に溶解させ、5%パラジウムカーボン粉末(0.56 g)を加えてアセトン/ドライアイス浴で-78°Cに冷却、その後真空ポンプで十分に減圧し、系内を水素ガスで置換した後、40°Cにて3日間かくはんした。セライトを通したろ過によりパラジウムカーボン粉末を除去し、溶媒を留去、乾燥させたところ、3,5-ビス(4-アミノフェノキシ)ベンゼン(BAPB, 3.12 g)を黄色固体として得られた。(収率: 76.3%)

$^1\text{H NMR}$, δ (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 5.01 (4H, s), 6.32 (1H, t, $J=2.5$ Hz), 6.44 (2H, dd, $J=8.0, 2.5$ Hz), 6.56 (4H, d, $J=11.0$ Hz), 6.73 (4H, d, $J=11.0$ Hz), 7.17 (1H, t, $J=8.0$ Hz).

IR, ν (KBr, cm^{-1}): 3403 (-NH₂), 2972, 2885, 1719 (C=O), 1124, 1078, 999, 891, 860, 756.

2.3 ポリマーの合成

2.3.1 ポリイミド(PI)の合成

アルゴン雰囲気下、三口フラスコ内で3,5-ビス(4-アミノフェノキシ)ベンゼン(BAP, 0.997 g, 3.41 mmol)を脱水1-メチル-2-ピロリドン(NMP, 5.6 mL)に溶解させた。一方、滴下ロート内にて4-4'-(ヘキサフルオロイソプロピリデン)ジフタル酸無水物(6FDA, 1.53 g, 3.41 mmol)を脱水NMP(8.6 mL)に溶解させ、その溶液を室温にてゆっくりと滴下させた後、さらに室温にて3時間かくはんした。その後、無水酢酸(2.6 mL)とトリエチルアミン(3.9 mL)を加え、60°Cで一晩かくはんした。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物を吸引ろ過後、熱真空乾燥することでポリイミドPI(2.10 g)を褐色固体として得た。(収率: 87.9%)

$^1\text{H NMR}$, δ (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 6.84 (3H, m), 7.19 (4H, d, $J=8.8$ Hz), 7.44 (5H, d, $J=8.8$ Hz),

7.72 (2H, s), 7.93 (2H, d, $J=7.6$ Hz), 8.14 (2H, d, $J=8.4$ Hz).

IR, ν (KBr, cm^{-1}): 3078, 1724 (C=O), 1593, 1504, 1381 (C-N), 1231, 1146, 1115, 964, 833, 779, 721, 590, 563, 513.

2.3.2 ホスホリルコリン基含有コポリイミド (PIPC1) の合成

アルゴン雰囲気下、三ツ口フラスコ内で BAPPC (0.321 g, 0.588 mmol) および BAPB (0.660 g, 2.26 mmol) を脱水 NMP (5.5 mL) に溶解させた。一方、滴下ロート内にて 6FDA (1.27 g, 2.86 mmol) を脱水 NMP (8.5 mL) に溶解させ、その溶液を室温にてゆっくりと滴下させた後、さらに室温にて一晩かくはんした。その後、無水酢酸 (2.2 mL) とトリエチルアミン (3.2 mL) を加え、60°C で一晩かくはんした。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物を吸引ろ過後、熱真空乾燥することでポリイミド PIPC1 (2.00 g) を褐色固体として得た。(収率: 93.1%)

$^1\text{H NMR}$, δ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): 3.07 (s), 3.88 (m), 3.98 (m), 4.34 (m), 6.84 (m), 7.18 (m), 7.45 (m), 7.73 (s), 7.93 (d, $J=6.8$ Hz), 8.15 (d, $J=7.2$ Hz).

IR, ν (KBr, cm^{-1}): 3080, 1728 (C=O), 1589, 1504, 1477, 1439, 1377 (C-N), 1300, 1258, 1211, 1150 (P=O), 1115, 964, 837, 721.

上記の重合反応において、BAPPC と BAPB の組成比を変えることにより PC 基含有率の異なるポリイミド (PIPC2, 3, 4) を合成した。なお、これらの IR および NMR スペクトルは上記に示す PIPC1 と同様であった。

2.4 キャラクターゼーション

赤外吸収 (IR) スペクトルは、粉末サンプルを KBr 法により島津製作所製フーリエ変換赤外分光光度計 FT-IR-8400 を用い測定した。 $^1\text{H NMR}$ スペクトルは、テトラメチルシラン (TMS) を基準物質としてブルカーバイオスピ (株) 製 Bruker Advance AV500 FT NMR 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: CCPB, カラム: TSK gels Multipore HXL-M \times 5 本, 検出器: RI-8010) を用い、展開溶媒には臭化リチウム (20 mM) を溶解させた *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) を、標準サンプルとして東ソー (株) 製標準ポリスチレンをそれぞれ用いて数平均および重量平均分子量を測定した。

ポリマーの熱物性は、セイコー電子工業 (株) 製熱重量分析装置 TG/DTA-6200 および示差走査熱量計 DSC-6200 を用いてサンプル量 5 mg を窒素雰囲気下、それぞれ昇温速度 10°C/min で測定した。

2.5 ナノシートの作製

2.5.1 クロロホルムを溶媒としたナノシート化

4 cm \times 4 cm のシリコン基板上に、PVA 水溶液 (濃度: 100 mg/mL) を 1 mL 滴下し、スピナー (ミカサ (株) MS-A100) を用いて回転数 4,000 rpm で 20 秒間スピナーコートした後、ホットプレート上で 70°C にて 2 分間乾燥させた。次に、生成した PVA 層の表面にポリマー (PI または PIPC1) のクロロホルム溶液を 0.5 mL 滴下して同様にスピナーコートし、ホットプレート上で 70°C にて 2 分間乾燥させた。その後、基板の四隅にカッターで傷をつけた基板を蒸留水で満たしたシャーレに浸漬して PVA を溶解させ、基板からポリマーのナノシートを剥離させた。最後に、シャーレ内の水を 10 回以上入れ替えることで PVA を十分に除去し、自己支持性のあるナノシートを回収した。なお、この際にポリマー溶液の濃度を 2.5 mg/mL \sim 50 mg/mL の範囲で段階的に調整し、膜厚の異なるナノシートを得た。

一方、大量のナノシートを作製するために、4 cm \times 4 cm のシリコン基板上に上記と同様に PVA 層とポリマー層を二層作製し乾燥させた上に、同様にしてスピナーにより PVA およびポリマーの層をさらに約 20 対積層させ乾燥させた。次に、基板の四隅にカッターで傷をつけた基板を蒸留水で満たしたシャーレに浸漬して PVA を溶解させ、基板からポリマーのナノシートを剥離させた。続いて、得られたナノシートをろ紙上で十分に水洗して PVA を除去し、自己支持性のあるナノシートを数十枚回収した。

2.5.2 ジメチルスルホキシド (DMSO) を溶媒としたナノシート化

4 cm \times 4 cm のシリコン基板上に、アルギン酸ナトリウム (Na-Alg) の水溶液 (濃度: 40 mg/mL) を 2 mL 滴下し、上記と同じスピナーを用いて回転数 4,000 rpm で 20 秒間スピナーコートした後、ホットプレート上で 70°C にて 2 分間乾燥させた。次に、生成した Na-Alg 層の表面にポリマー (PIPC4) の DMSO 溶液を 0.5 mL 滴下して同様にスピナーコートし、ホットプレート上で 100°C にて 30 分間乾燥させた。その後、基板の四隅にカッターで傷をつけた基板を蒸留水で満たしたシャーレに浸漬して PVA を溶解させ、基板からポリマーのナノシートを剥離させた。最後に、シャーレ内の水を Na-Alg による泡立ちがなくなるまで 10 回以上入れ替えることで Na-Alg を除去し、自己支持性のあるナノシートを回収した。なお、この際にポリマー溶液の濃度を 20 mg/mL \sim 40 mg/mL の範囲で段階的に調整し、膜厚の異なるナノシートを得た。

一方、このポリマー (PIPC4) のナノシートを大量に作製するためにグラビアロール法を用い、基板となる 12 cm 幅のポリエチレンテレフタレート (PET) フィルム上

に Na-Alg とポリマーの二層を積層した。Na-Alg の水溶液 (40 mg/mL) と PIPC4 の DMSO 溶液 (40 mg/mL) をそれぞれ用意し、PET フィルム上に Na-Alg のコーティングにはライン速度 0.2 m/min, グラビアロール速度 5.0 rpm, 乾燥温度 100°C で行い、その上に PIPC4 ポリマー溶液をライン速度 0.4 m/min, グラビアロール速度 15 rpm, 乾燥温度 145°C でコーティングした。その後、PET フィルムごと適当な面積に切断して、蒸留水で満たしたシャーレに浸漬しナノシート (幅 12 cm, 全長 5 m) を剥離した。続いて、得られたナノシートをろ紙上で十分に水洗して Na-Alg を除去し、自己支持性のあるナノシートを数十枚回収した。

2.6 ナノシートの膜厚測定

2.5 節で述べた方法で得られたナノシートを水面に浮かせた状態でシリコン基板上に平滑に貼り付け、十分に乾燥させた後、ピンセットでナノシート表面に傷を入れ、段差計 (小坂製作所製 Surfcoeder ET200) を用いて傷の底面とナノシート表面との段差から膜厚を測定した。

2.7 ナノシートの密着力測定

膜厚の異なるナノシートをシリコン基板上に貼り付け、一晩自然乾燥させた。超薄膜スクラッチ試験機 ((株) レスカ製 CSR-2000) に取り付けした後、ダイヤモンド圧子 (曲率半径: 25 μm) にてナノシートをスクラッチし臨界剥離荷重値を測定した (スクラッチ速度 10 $\mu\text{m/s}$, 励振レベル: 100 μm , 印加荷重速度: 0.17 mN/s)。得られた荷重値を各シートの膜厚で補正して密着力を算出した。

2.8 ナノシートの裁断化

2.5 節で述べた大量に作製したナノシートを 50 mL の蒸留水を入れたサンプル管に回収し、マイクロテック・ニチオン (株) 製ヒスコトロン超高速万能ホモジナイザー NS-51 PHYSCOTRON (シャフト: NS-20) を用いて、回転数 16,000 rpm にて裁断化した。その際に、裁断時間 2 分おきに裁断化ナノシート分散液を採取し、シリコン基板上でその一滴を乾燥させた後、実体顕微鏡 OLYMPUS SZX7 を用いて裁断化されたナノシート 1 枚の平均面積を測定した。

2.9 血小板粘着試験

ポリマー表面の血小板吸着性を調べるために、2.5 節で述べた方法で膜厚を 50 nm に調整した PI および PIPC1 ナノシートを円形の PET 基板 (直径: 14 mm, 厚さ: 0.2 mm, 面積: 154 mm²) の片面に貼り付けたサンプルを作製した。また、2.8 節で述べた方法で作製した PIPC1 および PIPC4 からなるナノシート水分散液 (濃度はそれぞれ、 2.0×10^5 sheets/mL および 4.1×10^4 sheets/mL) 220 μL を上記 PET 基板上に滴下し、一晩自然乾燥させて平板状のコーティングサンプルを作製した。一方、PIPC4 からなるナノシート分散液 220 μL をポリエチレンチューブ (長さ: 2.0 cm, 外径: 1.0 mm) の外側に滴下し

同様に自然乾燥させてチューブ状のコーティングサンプルを作製した。

東海大学「人を対象とする研究」に関する倫理委員会にて承認された計画書 (承認番号: 15013) に従って、健康人からヒト血液を得た。次に、3.8% (w/v) クエン酸ナトリウムを 10% (v/v) 添加したヒトの血液を遠心分離し、血小板多血漿 (PRP) を回収した。一方、上記のとおり作製した PET 基板あるいはポリエチレンチューブの外面にナノシートおよび裁断化ナノシートをそれぞれ被覆したサンプルに、pH 7.4 のリン酸緩衝液 (PBS) 3 mL に室温にて 24 時間浸漬させた。PBS を除去後、フィルムに 400 μL の多血漿板血漿 (PRP) を接触させ 37°C で 2 時間振とうさせた。次に、PBS で 3 回洗浄し、1.0 mL の 2.5% (v/v) 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 3 回洗浄した後終夜凍結乾燥した。その後、フィルム表面を金蒸着し、日立ハイテクノロジー (株) 製走査型電子顕微鏡 FE-SEM S-4800 を用いて血小板粘着挙動を観察した。なお、加速電圧は 3 kV, 倍率は 2000 倍で行った。

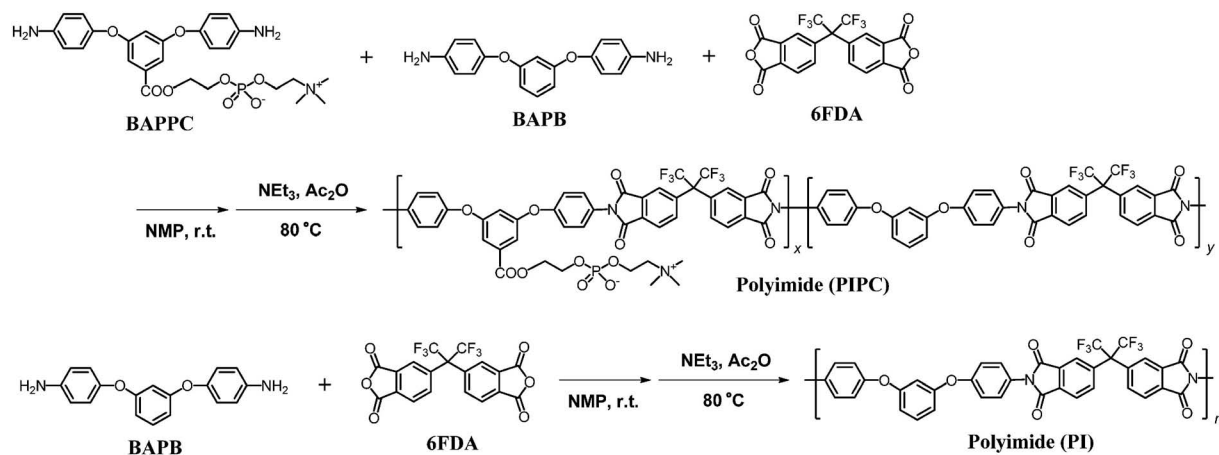
3 結果と考察

3.1 ポリマーの合成

Scheme 1 に示すように、PC 基含有ジアミンモノマー BAPPC とモノマー BAPB を混合し酸無水物 6FDA との重縮合および化学イミド化により、PC 基を有するポリイミド共重合体 (PIPC) の合成を行った。また、比較サンプルとして、同様な主鎖骨格を有し PC 基をもたないポリイミド (PI) を BAPB と 6FDA から合成した。Table 1 に得られたポリイミドの共重合組成および分子量を示す。共重合組成 x/y は、¹H NMR スペクトルにおける PC 基のメチル基 (3.07 ppm) と 6FDA 成分のベンゼン環 (7.93, 8.15 ppm) のプロトン比から決定した。いずれのポリマーも合成時に BAPPC と BAPB の仕込み比を変えることにより、PC 基含有率をコントロールすることができた。なお、Table 1 には載せていないが、BAPPC と BAPB の仕込み比を 75/25 (mol%) として共重合を行ったところポリマーが重合溶液から析出し、回収して乾燥させたところいずれの溶媒にも不溶なポリマーとなった。一方、得られた共重合体の数平均分子量 (M_n) は GPC 測定によるポリスチレン換算値で 10×10^3 前後であった。PC 基をもたない PI の M_n が 78.7×10^3 であることから、BAPPC は極性の高い PC 基を有しているため吸水性も高く重縮合の際に分子量が大きくなりやすいことが考えられる。

3.2 ポリマーの溶解性と熱安定性

Table 2 にそれぞれのポリイミドの溶解性を示す。一般に、6FDA から得られるポリイミドは有機溶媒に可溶であることが知られており、表中の PI は水やアルコー

**Table 1.** Composition and molecular weight of polymers

Code	Molar ratio of monomers, BAPPC/BAPB (mol%)	Composition of copolymers, x/y ^{a)} (mol%)	$M_n \times 10^{-3}$ ^{b)}	M_w/M_n ^{b)}
PI	0/100	0/100	78.7	1.93
PIPC1	20/80	18/82	14.3	1.54
PIPC2	25/75	24/76	11.3	1.32
PIPC3	30/70	40/60	11.2	1.45
PIPC4	50/50	48/52	8.24	1.23

^{a)} Compositions of copolymers were calculated from the ratio of peak intensities in ¹H NMR spectra. ^{b)} Number-average and weight-average molecular weights (M_n and M_w) were obtained by gel permeation chromatography using DMF (LiBr 20 mM solution) as an eluent.

Table 2. Solubility of polymers

Code	Solubility ^{a)}							
	Water	Ethanol	Chloroform	THF	DMF	DMAc	DMSO	NMP
PI	×	×	○	○	○	○	○	○
PIPC1	×	×	○	○	○	○	○	○
PIPC2	×	×	△	○	○	○	○	○
PIPC3	×	×	×	×	○	○	○	○
PIPC4	×	×	×	×	△	△	○	○

^{a)} The concentration of the solubility test was 10 mg/mL in each solvent. Symbols: ○; soluble, △; partially soluble, ×; insoluble.

ルには不溶で、クロロホルムやテトラヒドロフラン (THF) の他 DMF, DMSO などの非プロトン系極性溶媒に可溶であった。一方、PC 基含有率が 18 mol% の PIPC1 は PI と同様な溶解性を示したが、PIPC2~4 では PC 基含有率が高くなると溶解性が低下する傾向が見られ、PC 基含有率が 40 mol% 以上になるとクロロホルム、THF などの低沸点溶媒に不溶となり高沸点の非プロトン系極性溶媒にのみ可溶であった。このような傾向は以前合成した PC 基含有ポリアミドやポリウレタンにおいても見られており^{19)~23)}、PC 基含有率が高いポリイミドでも側鎖 PC 基どうし、あるいは PC 基とイミド結合などの極性基が強く相互作用し溶解性を低下させるものと考えられる。

Figure 1 に 3 種のポリイミド PI, PIPC1, PIPC4 の熱重

量分析 (TGA) の結果を示す。PI の熱分解は 450°C 付近から始まり 5% 重量減少温度 (T_{d5}) が約 510°C であったことから、ポリイミドの優れた耐熱性が確認できた。一方、PIPC1 および PIPC4 はいずれも 210°C 付近から分解が開始しており、それらの T_{d5} はそれぞれ 350°C および 280°C であった。これまでに合成した PC 基含有ポリマーにおいても 200°C 付近で分解が開始する^{19)~23)} ことから、PC 基含有ポリマーの熱分解は PC 基の分解が引き金となって始まりその分解温度は 200~210°C 付近であることが考えられる。このように PC 基を導入することで分解開始温度が低下するものの、200°C 以上までは熱安定性を有していることから高温蒸気 (130~150°C) による加熱滅菌には十分な耐熱性を示す材料と言える。一方、-70°C から 200°C (分解温度付近) までの温度範囲で

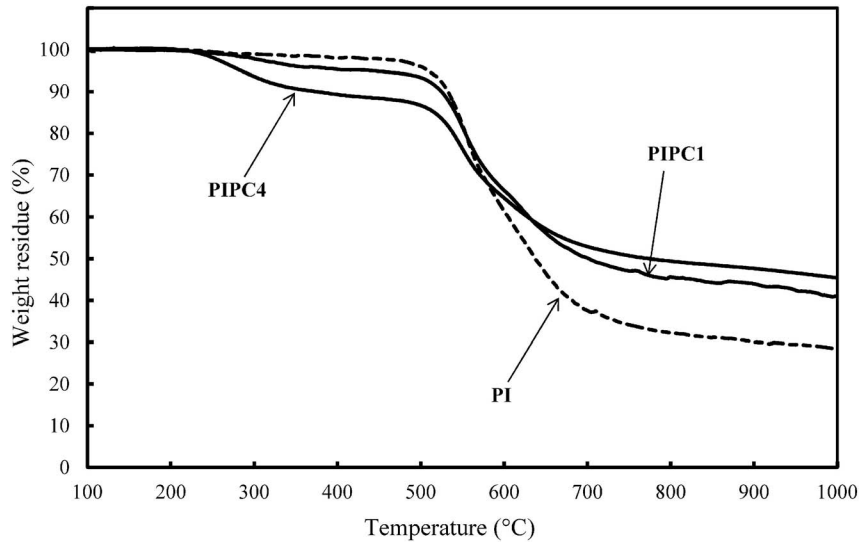


Figure 1. TGA curves of polyimides at a heating rate of 10°C/min in N₂ flow.

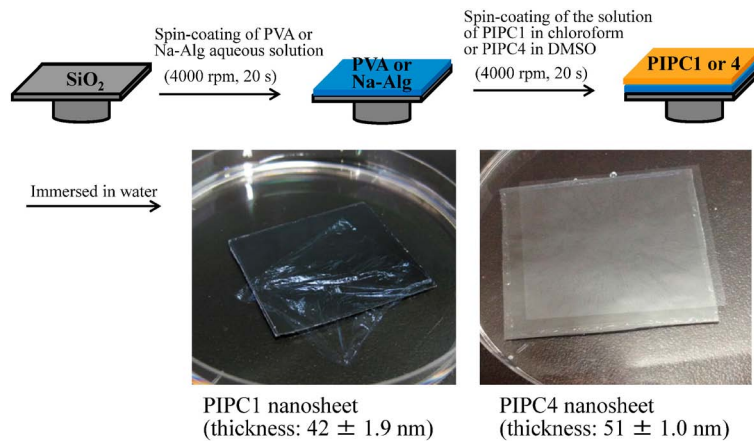


Figure 2. (Color online) Schematic illustrations of the fabrication of nanosheets and the images of PIPC1 and PIPC4 nanosheets (4 × 4 cm²) suspended in water.

示差走査熱量分析 (DSC) を行ったところ、PI および PIPC1~4 ではガラス転移温度 (T_g) や融点などの転移が観測されなかった。したがって、これらの PC 基含有ポリイミドは分解温度まではガラス状態であると考えている。

3.3 ナノシートの作製と密着力

これらの PC 基含有ポリイミドは有機溶媒に可溶であり、ポリマー溶液から基材表面への薄膜コーティングが可能となる。しかしながら、Table 1 に示したように、PC 基含有率が高まるにつれて沸点の高い非プロトン系極性溶媒にのみ可溶となるため、コーティングにおいては乾燥させにくく、しかも残存すると毒性を発現するような溶媒を使用しなければならない。一方、膜厚が 100 nm 以下のポリマー超薄膜 (ナノシート) の簡便な製造方法が開発され、得られるナノシートは膜厚が薄くなるに

伴い基材表面への接着力が大幅に高まることが知られている²⁴⁾。そこで、これらのポリマーをナノシートに加工することで有機溶媒を使わないコーティング材となるのではないかと考え、以下の検討を行った。

まず、低沸点溶媒に可溶性の PI と PIPC1 について、Figure 2 に示す岡村、武岡らの手法²⁴⁾に従ってナノシートの作製を試みた。水溶性ポリマーである PVA 溶液をシリコン基板上にスピコートして乾燥させた後、その上にポリマーのクロロホルム溶液をスピコートして乾燥させ、基板ごと水に浸漬させた。その結果、Figure 2 の写真 (左) に示すように、PVA 層が水に溶解して自己支持性のあるポリマー超薄膜が水中で剥離して得られた。さらに、PC 含有率の高い PIPC4 についても同様にナノシート化を試みた。しかし、PIPC4 はクロロホルムには不溶性のため、その DMSO 溶液を PVA 層に積層したとこ

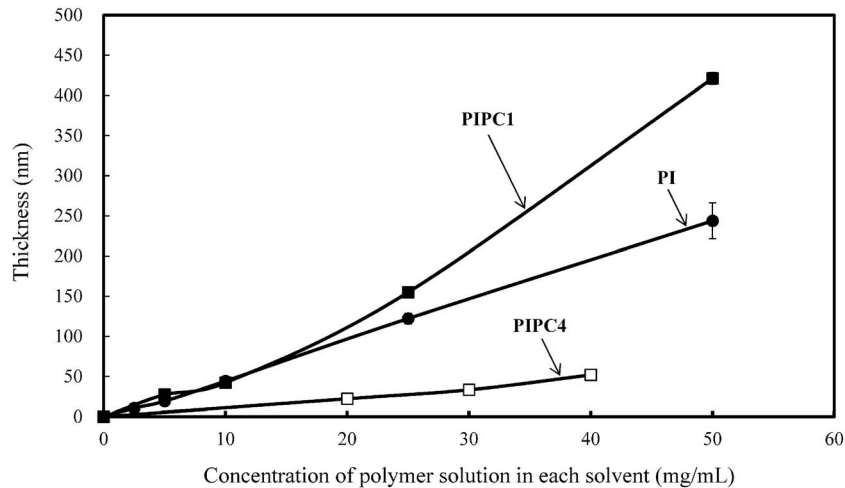


Figure 3. The effect of the concentration of polymer solution on the film thickness of nanosheet. PI and PIPIC1 were dissolved in chloroform, and PIPIC4 was dissolved in DMSO.

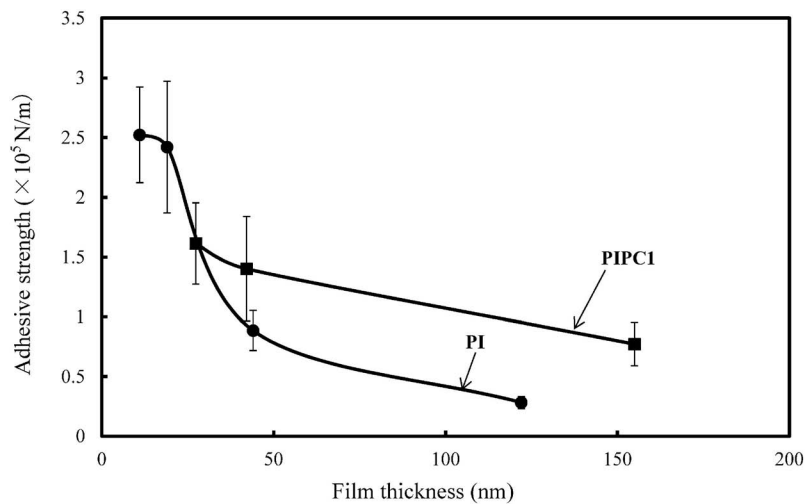


Figure 4. Relationship between the adhesive strength and the thickness of nanosheets.

る PVA 層が DMSO に溶解し超薄膜を剥離することができなかった。そこで、犠牲層としての水溶性ポリマーをアルギン酸ナトリウムに変えて、その上にポリマーの DMSO 溶液をスピコートし乾燥後水に浸漬したところ、Figure 2 の写真(右)に示すように自己支持性のある PIPIC4 のナノシートが得られた。すなわち、非プロトン系極性溶媒にのみ可溶性ポリマーにおいても、アルギン酸ナトリウムを犠牲層とすることにより簡便にナノシートを作製できる手法を見いだした。

ナノシートの膜厚を調整するため、上記の作製手法においてポリマー溶液の濃度を変化させてそれぞれのナノシートを作製した。その結果、Figure 3 に示すように、2.5~50 mg/mL の濃度範囲でポリマーの溶液濃度を変化させることにより、ナノシートの膜厚を数十 nm から数百 nm の範囲でコントロールすることができた。これら

のポリマーの中で、PIPIC4 の場合は DMSO 溶液から作製したものであるが、クロロホルム溶液から作製した PI および PIPIC1 のナノシートに比べて濃度変化に対する膜厚の差異が小さく、同じ濃度でもナノシートの膜厚が薄くなる傾向が見られた。これは、PIPIC4 の DMSO 溶液の粘度が低いと考えられ、スピコート時の回転数を調整することでより厚いナノシートの作製も可能と考えている。

膜厚が大きく異なる PI (膜厚 11~122 nm) および PIPIC1 (膜厚 27~155 nm) のナノシートについて、膜厚の違いによるシリコン基板に対する密着力の変化を測定した。その結果を Figure 4 に示す。図からわかるように、いずれの場合も膜厚が薄くなるにつれて密着力が高まる傾向が見られた。このような傾向は、この手法で初めて作製されたポリ乳酸ナノシートにおいてすでに見いだされてお

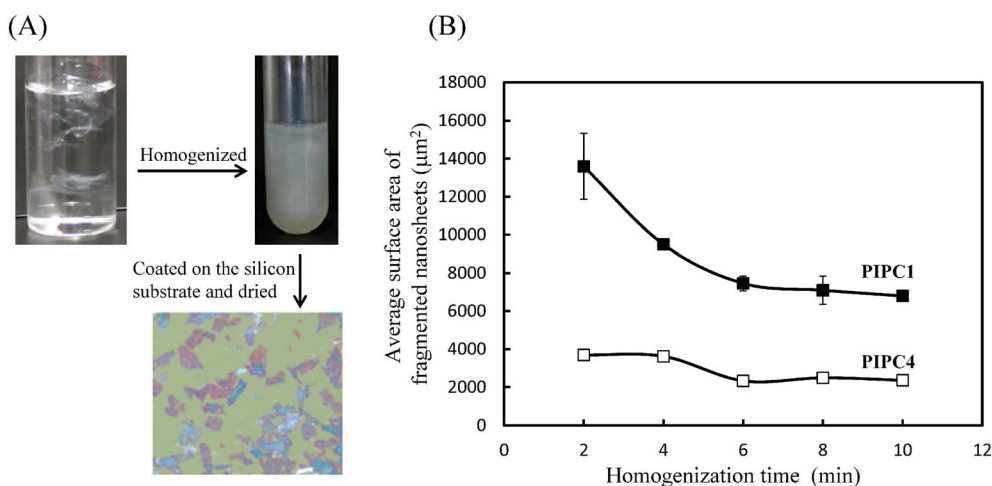


Figure 5. (Color online) (A) Images of PIPC1 nanosheets dispersed in water before and after homogenization and the coated surface on silicon substrate. (B) Correlation of the average surface area of fragmented PIPC nanosheets with the homogenization time.

り²⁴⁾, 超薄膜なるが故に界面の微小な凹凸に追従し密着力が高まるものと考察されている。したがって、PC基含有ポリイミドにおいても厚みが50 nm前後のナノシートを作製すれば、接着剤を使用する必要もなく器材表面を効果的にコーティングできることが期待される。

一方、MPCポリマー (poly(MPC-co-methyl methacrylate), poly(MPC-co-2-ethylhexyl methacrylate), どちらもMPC含有率: 30 mol%)を用いて同様にナノシートの作製を試みた。ただし、MPCポリマーのエタノール溶液を用いて犠牲層となるPVA膜上にスピコートすると犠牲層であるPVAが溶解してしまった。そこで、酢酸セルロース(酸化度: 55%)を犠牲層として使い、二種のMPCポリマーのエタノール溶液(10 mg/mL)をそれぞれスピコートして乾燥させた後、基板ごとアセトンに浸漬させた。その結果、アセトン中で犠牲層が溶解し、膜厚がそれぞれ約33 nmおよび約51 nmの自己支持性のあるナノシートを得ることができた。しかしながら、その後無限希釈によりアセトンを水に置換したところ、ナノシートは大きく膨潤して自己支持性が失われた。すなわち、MPCポリマーからナノシートを作製することは可能であるが、得られるナノシートは水中で膨潤しフィルム形状を失うことが判明した。したがって、親水性のPC基を有しているにもかかわらず耐水性の高い超薄膜が作製できる点で芳香族ポリイミドからなる主鎖構造は効果的であると考えている。

3.4 裁断化ナノシート分散液の作製とコーティング能

以上述べたように、厚みが数十 nmでセンチメートルサイズからなる大きなアスペクト比をもつナノシートを合成したPC基含有ポリイミドから作製することがで

き、それらは高い密着力を示すことを明らかにした。しかしながら、このようなサイズのナノシートでコーティングを行うにあたり、平滑な界面を被覆するには有効であるが、チューブなどの曲面や複雑な界面をもつ器材表面の被覆には不向きである。岡村、武岡らは、さらにナノシートをサブミリメートルサイズに裁断化して水分散液とすることで、それを目的界面に滴下、あるいは分散液中に浸漬させるだけでコーティングできることを見だし、熱傷創傷被覆材などへの医療応用が可能となることを報告している^{25),26)}。そこで、生体適合性界面を構築するために有効と思われる本研究のPC基含有ポリイミドにおいても裁断化ナノシートの作製を試みた。

そのためにはナノシートを効率よく大量に作製する必要があるため、2.5節で述べた手法によりPIPC1およびPIPC4のナノシートをスピコートによる積層法およびグラビアロール法によりそれぞれ大量に作製した。得られたPIPC1およびPIPC4のナノシートの膜厚は、それぞれ 42.1 ± 1.9 nmおよび 133 ± 9.8 nmであった。これらのナノシートを2.8節で述べた方法によりホモジナイザーで裁断化したところ、Figure 5(A)に示すように、裁断化された断片が水中に均一に分散した分散液が得られ、さらにそれをシリコン基板上に滴下して乾かすとナノシート断片がパッチワーク状に表面に貼りつくことがわかった。裁断化する際の裁断化時間と断片の平均面積との関係をFigure 5(B)に示す。図からわかるように、裁断化時間6分以降で断片の面積はほぼ一定となり、PIPC1では約 $6800 \mu\text{m}^2$ 、PIPC4では約 $2400 \mu\text{m}^2$ の面積からなる μm サイズの裁断化ナノシートの水分散液がそれぞれ得られた。

次に、得られた裁断化ナノシート分散液を用いた基板

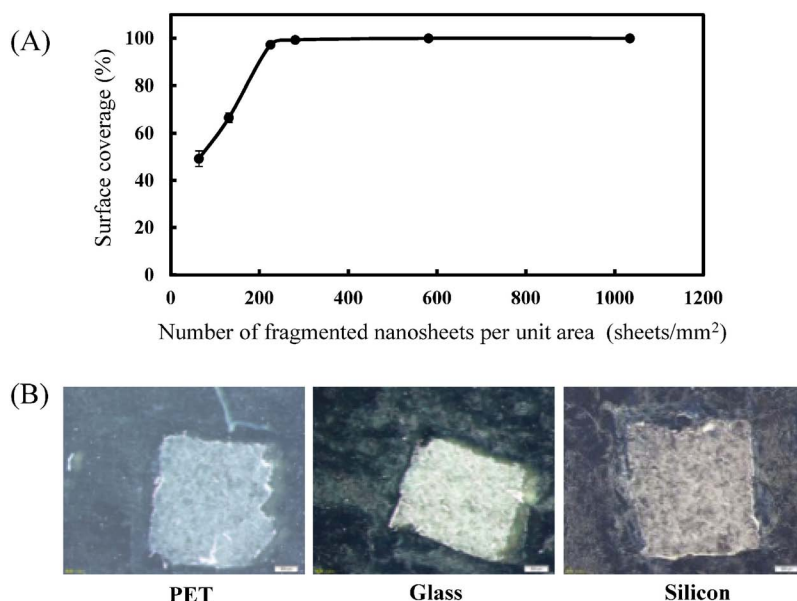


Figure 6. (Color online) (A) Relationship between the surface coverage and the number of fragmented PIPC1 nanosheets per unit area. (B) Images of the coated surfaces on each substrate with the area of $3.0 \times 3.0 \text{ mm}^2$.

表面の被覆を行う際に、被覆率を100%とするための最適な分散液濃度を調べる目的で以下の実験を行った。裁断化した PIPC1 ナノシート分散液を $10^4 \sim 10^6$ sheets/mL の範囲で濃度調整し、それぞれの分散液 $20 \mu\text{L}$ を $3.0 \times 3.0 \text{ mm}^2$ の面積に区切ったシリコン基板の上に滴下、乾燥させた後、光学顕微鏡で表面の被覆率を観察した。そして、それぞれの濃度における分散液 $20 \mu\text{L}$ 中のナノシートの枚数を算出し、被覆面における単位面積当たりの枚数に換算した。被覆面の単位面積当たりのナノシート断片の枚数に対する表面被覆率の関係を Figure 6(A) に示す。図からわかるように、100%の被覆率を達成するためには PIPC1 では約 600 sheets/mm^2 のナノシート断片が必要であり、そのための分散液濃度は $2.0 \times 10^5 \text{ sheets/mL}$ であった。同様な実験を PIPC4 のナノシート分散液についても行い、PIPC4 の場合は、100%の被覆率を達成するためには約 6400 sheets/mm^2 のナノシート断片が必要で、そのための分散液濃度は $4.1 \times 10^4 \text{ sheets/mL}$ であった。また、この濃度の PIPC4 のナノシート分散液 $20 \mu\text{L}$ をそれぞれ $3.0 \times 3.0 \text{ mm}^2$ の面積に区切った PET、ガラスおよびシリコン基板に滴下して乾燥させた。その結果、Figure 6(B) に示すように、いずれの基板でも表面が完全に被覆されており、これらのコーティング表面には PIPC4 が強固に貼りついていることを確認した。したがって、ポリマーの種類によって基板を被覆するための最適な分散液濃度は異なるものの、これらの裁断化ナノシート分散液による表面コーティングがさまざまな基板に対して可能となることが裏付けられた。

3.5 ナノシート被覆表面の血液適合性

このようにして得られたナノシート被覆表面の血液適合性を調べる目的で、血小板吸着試験を行った。ヒトの PRP をナノシートで被覆した PET 基板およびポリエチレンチューブに一定時間接触させ、その後の表面を SEM 観察した写真を Figure 7 に示す。Figure 7(A) はここで用いた PET 基板に PRP を接触させた後の表面であり、多くの血小板が PET 表面に吸着し、さらには吸着した血小板が偽足を出して活性化していることが確認できる。また、Figure 7(B) および 7(C) は PET 基板に PI および PIPC1 のナノシートを貼り付けた表面であるが、PC 基のない PI 表面は PET ほどではないが血小板吸着とその活性化が見られるのに対して、PIPC1 表面の血小板吸着量は大幅に低減していることがわかる。一方、Figure 7(D) および 7(E) はそれぞれ PIPC1 と PIPC4 の裁断化ナノシート分散液で被覆した PET 基板表面であり、どちらも血小板の吸着がほとんど見られない。とくに、PIPC4 で被覆した界面は、どの部位を観察しても血小板吸着がまったく見られなかった。さらに、PIPC4 の裁断化ナノシート分散液で被覆したポリエチレンチューブにおいても、Figure 7(F) に示すように、血小板吸着はほとんど観察されなかった。また、Figure 7(D), 7(E), 7(F) の SEM 写真では、いずれも裁断化したナノシート断片が折りがさなって被覆されている様子が断片の境界面のスジとして観察される。

したがって、本研究で合成した PC 基含有ポリイミドから得られるナノシートで被覆した基板表面は優れた

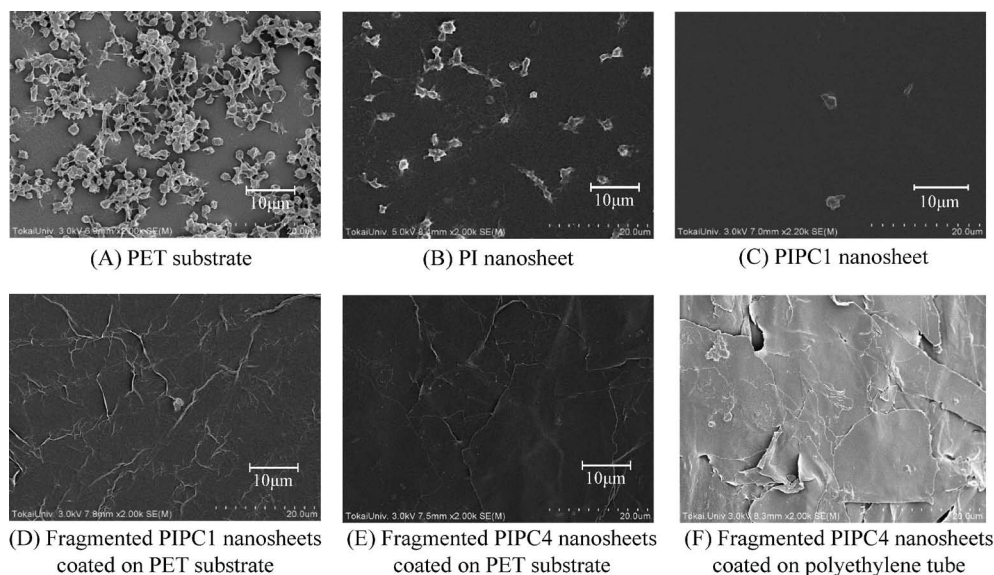


Figure 7. SEM images of various surfaces after contact with human platelet-rich plasma (PRP) at 37°C for 2 h.

血液適合性を発現することが確認できた。さらに、チューブ表面のような湾曲した界面においても、裁断化ナノシート分散液を用いて効果的に表面コーティングが可能となりその界面機能が発現することを明らかにした。また、このような手法により形成される被覆表面の耐久性については今後詳しい検討が必要と考えているが、今回被覆したチューブ状サンプルを数回曲げ伸ばした後SEM観察を行っても大きな表面形状の変化は認められなかった。

4 結 言

以上述べたように、本研究では、これまで筆者らが開発したPC基含有ジアミンモノマーを出発原料として、200°C程度までの耐熱性を有するPC基含有ポリイミドを新たに合成し、得られたポリマーから厚みが数十nmのナノシートおよび裁断化ナノシート分散液の簡便な作製が可能となることを明らかにした。得られた裁断化ナノシート分散液は水分散液であることから、有機溶媒を用いることなくさまざまな形状の基材表面に安全にPC基含有ポリイミドを被覆することができる。また、血液適合性を評価したところ、PC基含有ポリイミドからなるナノシートをコーティングした界面は血小板吸着がほとんど観察されず、高度な生体適合性を発現することが確認された。さらに、超薄膜化することで密着力も高まるため、このようなPC基含有ポリマーからなる裁断化ナノシート分散液は、医療機器その他のさまざまな器材界面に高度な生体適合性を付与するための安全かつ強固なコーティング材として大いに期待できる。今後は、これまでに開発してきたPC基含有ポリマーについてグラ

ビアロール法による効率的なナノシートの量産化手法を確立して、カテーテルやマイクロ流路の内部など複雑かつ微小な界面に高度な生体適合性を付与するための被覆材料としての応用研究に繋げていきたいと考えている。

謝 辞 MPCポリマーを快くご提供いただいた東京大学工学系研究科石原一彦教授に心より感謝の意を表する。

文 献

- 1) K. Ishihara, T. Ueda, and N. Nakabayashi, *Polym. J.*, **22**, 355 (1990).
- 2) K. Ishihara, R. Aragaki, T. Ueda, A. Watanabe, and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**, 1069 (1990).
- 3) T. Ueda, H. Oshida, K. Kurita, K. Ishihara, and N. Nakabayashi, *Polym. J.*, **24**, 1259 (1992).
- 4) K. Ishihara, N. P. Ziats, B. P. Tierney, N. Nakabayashi, and J. M. Anderson, *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, 1397 (1991).
- 5) Y. Iwasaki, A. Mikami, K. Kurita, N. Yui, K. Ishihara, and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **36**, 508 (1997).
- 6) K. Ishihara, S. Tanaka, N. Furukawa, N. Nakabayashi, and K. Kurita, *J. Biomed. Mater. Res.*, **32**, 391 (1996).
- 7) K. Ishihara, N. Shibata, S. Tanaka, Y. Iwasaki, N. Nakabayashi, and T. Kurosaki, *J. Biomed. Mater. Res.*, **32**, 401 (1996).
- 8) K. Ishihara and Y. Iwasaki, *Polym. Adv. Technol.*, **11**, 626 (2000).
- 9) N. Morimoto, A. Watanabe, Y. Iwasaki, K. Akiyoshi, and Ishihara, *Biomaterials*, **25**, 5353 (2004).
- 10) S. Sawada, Y. Iwasaki, N. Nakabayashi, and K. Ishihara, *J. Biomed. Mater. Res.*, **79A**, 476 (2006).
- 11) K. Ishihara and M. Takai, *J. Royal Soc. Interface*, **6**, S279 (2009).
- 12) Y. Inoue, T. Nakanishi, and K. Ishihara, *Langmuir*, **29**, 10752 (2013).

- 13) X. Lin, K. Fukazawa, and K. Ishihara, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **7**, 17489 (2015).
- 14) W. Chen, Y. Inoue, and K. Ishihara, *Colloids Surf., B*, **135**, 365 (2015).
- 15) K. Ishihara, *Polym. J.*, **47**, 585 (2015).
- 16) Y. Nagase, M. Oku, Y. Iwasaki, and K. Ishihara, *Polym. J.*, **39**, 712 (2007).
- 17) K. Horiguchi, N. Shimoyamada, D. Nagawa, Y. Nagase, Y. Iwasaki, and K. Ishihara, *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, **33**, 1261 (2008).
- 18) Y. Nagase, S. Nakajima, M. Oku, Y. Iwasaki, and K. Ishihara, *Polym. J.*, **40**, 1149 (2008).
- 19) Y. Nagase and K. Horiguchi, "Biomedical Engineering — Frontiers and Challenges", Chapter 11, InTech, Croatia (2011), pp. 217–232.
- 20) Y. Narita, W. Sirithet, Y. Okamura, and Y. Nagase, *Kobunshi Ronbunshu*, **70**, 199 (2013).
- 21) Y. Sakagami, K. Horiguchi, Y. Narita, W. Sirithet, K. Morita, and Y. Nagase, *Polym. J.*, **45**, 1159 (2013).
- 22) W. Sirithet, Y. Narita, and Y. Nagase, *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, **38**, 473 (2013).
- 23) W. Sirithet, K. Morita, A. Iwano, T. Komachi, Y. Okamura, and Y. Nagase, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **25**, 1540 (2014).
- 24) Y. Okamura, K. Kabata, M. Kinoshita, D. Saito, and S. Takeoka, *Adv. Mater.*, **21**, 4388 (2009).
- 25) Y. Okamura, K. Kabata, M. Kinoshita, H. Miyazaki, A. Saito, T. Fujie, S. Ohtsubo, D. Saito, and S. Takeoka, *Adv. Mater.*, **25**, 545 (2013).
- 26) Y. Okamura, *Kobunshi Ronbunshu*, **70**, 351 (2013).

[Original Papers]

Synthesis of Phosphorylcholine-Containing Polyimides and the Fabrication of Biocompatible Nanosheets Thereof

Kohei ASAO^{*1}, Mari OGINO^{*1}, Atsushi IWANO^{*1}, Yosuke OKAMURA^{*1}, Shinji TAKEOKA^{*2}, and Yu NAGASE^{*1}

^{*1}Course of Industrial Chemistry, Graduate School of Engineering, Tokai University (4-1-1 Kitakaname, Hiratsuka 259-1292, Japan)

^{*2}Department of Life Science and Medical Bioscience, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University (2-2 Wakamatsucho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8480, Japan)

The synthesis of aromatic polyimide containing phosphorylcholine (PC) group was carried out by the co-polycondensation of a PC-containing diamine monomer and 3,5-bis(4-aminophenoxy)benzene with 4,4'-hexafluoroisopropylidene diphthalic anhydride (6FDA) followed by chemical imidization. The solubility of the polyimides decreased as the PC content increased, and the polyimides containing less than 50 mol% PC units were soluble in aprotic polar solvents such as *N,N*-dimethylformamide, dimethyl sulfoxide and *N*-methyl-2-pyrrolidone. The nanosheets were successfully fabricated from the PC-containing polyimides by spin coating using poly(vinyl alcohol) or Na alginate as a sacrificial layer, which exhibited a high adhesive strength. Large quantities of nanosheets were also fabricated by a laminating method. Fragmented nanosheets were successfully fabricated by homogenizing the nanosheets suspended in water for 10 min at 16000 rpm. Fragmented nanosheets could be dispersed in water and adhered to the surface of various substrates in a patchwork pattern. Good blood compatibility was observed on the polyimide-coated surfaces. Therefore, the nanosheets and fragmented nanosheets can be useful for biocompatible coating materials.

KEY WORDS Phosphorylcholine / Polyimide / Nanosheet / Biocompatibility / Coating Material /

(Received September 7, 2015; Accepted October 14, 2015; Advance Publication December 29, 2015) [*Kobunshi Ronbunshu*, **73**, 76–86 (2016)]
©2016, The Society of Polymer Science, Japan