

ラクトース・グルコースを配したスチレン誘導体の共重合性

福留功博

Copolymerizability of Styrene Derivative Having Lactose or Glucose Residue

Norihiro FUKUDOME

(Accepted September 30, 2013)

Abstract Copolymerization of styrene derivative having lactose residue (VLA) and styrene derivative having glucose residue (VGA), that of VLA and acrylamide (AAM) were performed by free-radical reaction at 60°C for 140 min using 2,2'-azodiisobutyronitrile(AIBN) as the initiator in dimethyl sulfoxide under an oxygen-free atmosphere. In order to evaluate copolymerizability of VLA and VGA, the monomer reactivity ratio was determined by curve fit method, intersection method and Fineman-Ross method. As a result, The Alfrey-Price's Q and e values for the VLA were obtained as 1.97~2.27 and 1.13~1.25, respectively, those for the VGA were examined in detail.

Keywords [Copolymerizability, Glycosylated monomer, Q value, e value]

1 序論

一つのモノマーのみを用いて合成された単独重合体は、その分子量・コンフォーメーションを変化させることで、様々な物性がある程度まではコントロールすることが可能であるが、これには限界がある。そこで、複数のモノマーを共重合させ、単独重合体では引き出すことのできない性質を持つ新たな共重合体を合成することは、高分子化合物の軟化性、溶解性、結晶性、染色性、弾性、機械的性質、電気的性質を改変する有用な手法である。とりわけ、ラジカル共重合による共重合体の合成は、簡便で工業的に非常に多くの付加価値の高い共重合体を生み出している。

肝臓は種々の複雑な生化学反応によって解毒機能、代謝機能など重要な役割を果たす臓器である。肝炎、肝硬変、肝臓癌など重篤な疾患に対しては臓器移植が有効な手段であるが、限られた提供数など大きな

障害があり、とりわけ日本においては人工肝臓に対して大きな期待がよせられている¹⁾。そこで、赤池らは肝細胞を人工基質材料上に固定化したハイブリッド型人工肝臓の設計を試みた。人工基質材料（高分子材料）に特異的に肝細胞を接着させるシステムに、肝実質細胞の有するアシアロ糖タンパク質に対するレセプターと、そのリガンド分子であるガラクトースの特異性を利用した。ガラクトース残基を有するスチレン誘導体（VLA）を合成し、さらにその単独重合体（PVLA）を合成した。市販のポリスチレン製培養シャーレ表面を、種々の濃度の PVLA 水溶液にさらすと、PVLA 水溶液の濃度依存的に PVLA が疎水的相互作用によりシャーレ表面に吸着し、このことでシャーレ表面のガラクトース残基の密度を容易にコントロールできることを明らかにした。また、PVLA 吸着シャーレ上での肝細胞形態変化や増殖活性や分化機能について調べたところ、ガラクトース残基の密度が低いと肝細胞は伸展形態をとり増

殖活性が高まり、逆にガラクトース残基の密度が高いと肝細胞は球形形態をとり分化機能が高まることを明らかにした^{1~4)}。このガラクトース残基(リガンド分子)とアシアロ糖タンパク質レセプターの特異性は、肝細胞をターゲットとした薬物送達システム(DDS)への応用も期待されている^{5,6)}。更にPVLAのガラクトース残基の6位のヒドロキシメチル基は、ガラクトースオキシダーゼにより選択的にアルデヒド基に変換され、種々の生理活性物質を固定化できる。既報において、PVLAに還元アミノ化法により固定化されたトロンビンが血管内皮細胞の接着リガンドとして有効であり、トロンビン依存的に接着した血管内皮細胞の増殖性、分化機能がトロンビンの固定化密度によりコントロールされることを明らかにした⁷⁾。

本研究では、ガラクトース残基あるいは、ガラクトース残基中の生理活性物質固定化サイト(アルデヒド基)の密度をVLAとグルコースを有するスチレン誘導体(VGA)の共重合体で制御すべく、その共重合性をモノマー反応性比から評価し、Q値、e値が既知の市販モノマーであるアクリルアミド(AAm)とVLAの共重合挙動からVLA, VGAのQ値、e値を算出したので報告する。

2 実験および共重合性の評価法

2.1 VLAとVGAの共重合体の合成

2.1.1 試薬

ラクトースを配したスチレン誘導体(VLA)、グルコースを配したスチレン誘導体(VGA)(図1)は、

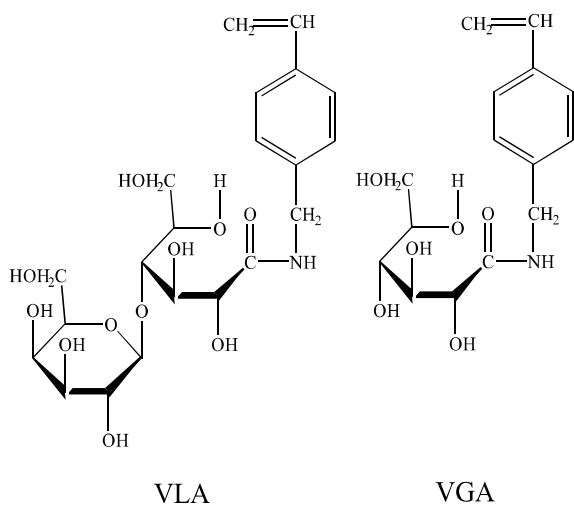


図1 VLA、VGAの化学構造

小林らの手法に従い合成した⁸⁾。ジメチルスルホキシド(DMSO)、アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)

は、米山薬品工業(株)製のものを使用した。

2.1.2 VLAとVGAの共重合体の合成操作

VLA, VGAのDMSO溶液(0.90mol/ml)を調製し、poly(VLA50-co-VGA)の場合、VLA, VGAのDMSO溶液をそれぞれ0.89mlずつアンプル管に取り、更に所定量の開始剤を仕込むためAIBNのDMSO溶液(0.080mol/ml)を200μl加え、攪拌し均一溶液とし脱気を4回行い無酸素下、60°Cで最大140分反応させた。重合後、反応溶液を酢酸エチル(14~40ml)中にゆっくり滴下し、ポリマーを沈殿させ1時間攪拌後、吸引ろ過して得られたポリマーを蒸留水に溶解させ透析を行い、未反応モノマーを除去して凍結乾燥しpoly(VLA50-co-VGA)を得た(表1)。

表1 VLAとVGAの共重合

サンプル No.	サンプル名	モノマー (mmol)		DMSO (ml)
		VLA	VGA	
1	Poly(VLA10 ^{a)} -co-VGA)	0.16	1.44	1.78
2	Poly(VLA30 ^{a)} -co-VGA)	0.48	1.12	1.78
3	Poly(VLA50 ^{a)} -co-VGA)	0.80	0.80	1.78
4	Poly(VLA70 ^{a)} -co-VGA)	1.12	0.48	1.78
5	Poly(VLA90 ^{a)} -co-VGA)	1.44	0.16	1.78

a)仕込中のVLAのmol%

※AIBN/モノマー = 1/100

2.2 VLAとAAmの共重合体の合成

2.2.1 試薬

アクリルアミド(AAm)は、半井化学薬品(株)製の電気泳動用試薬を使用した。ジメチルスルホキシド(DMSO)、アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)は、米山薬品工業(株)製のものを使用した。

2.2.2 VLAとAAmの共重合体の合成操作

VLA, AAmのDMSO溶液(0.90mol/ml)を調製し、poly(VLA50-co-AAm)の場合、VLA, AAmのDMSO溶液をそれぞれ0.89mlずつアンプル管に取り、更に所定量の開始剤を仕込むためAIBNのDMSO溶液(0.080mol/ml)を200μl加え、攪拌し均一溶液とし脱気を5~6回行い無酸素下、60°Cで最大140分反応させた。この反応溶液を41mlの酢酸エチル中にゆっくり滴下し、ポリマーを沈殿させ1時間攪拌後、吸引ろ過して得られたポリマーを蒸留水に溶解させ透析を行い、未反応モノマーを除去して凍結乾燥しpoly(VLA50-co-AAm)を得た(表2)。

表 2 VLA と AAm の共重合

サンプル No.	サンプル名	モノマー (mmol)		DMSO (ml)
		VLA	AAm	
6	Poly(VLA10 ^{a)} -co-AAm)	0.16	1.44	1.78
7	Poly(VLA30 ^{a)} -co-AAm)	0.48	1.12	1.78
8	Poly(VLA50 ^{a)} -co-AAm)	0.80	0.80	1.78
9	Poly(VLA70 ^{a)} -co-AAm)	1.12	0.48	1.78
10	Poly(VLA90 ^{a)} -co-AAm)	1.44	0.16	1.78

a) 仕込中の VLA の mol%

※AIBN/モノマー = 1/100

2.3 共重合体中のガラクトース残基の定量

2.3.1 試薬

ガラクトースオキシダーゼは、SIGMA 製 (G-7907) のものを使用した。ペルオキシダーゼは、SIGMA 製 (P-8125) のものを使用した。o-アニシジンは、東京化成工業㈱のものを使用した。

2.3.2 ガラクトースオキシダーゼを用いた酵素反応によるガラクトース残基の定量

所定量のポリマーをリン酸緩衝溶液 (PBS, pH7.0) に溶解した後、ペルオキシダーゼ PBS 溶液 (0.24unit/μl)、o-アニシジン溶液 (エタノール 90.7%、蒸留水 4.8%、o-アニシジン 4.6%) をそれぞれ 10μl 加え攪拌して、初期吸光度 (420nm) を測定した。これにガラクトースオキシダーゼ PBS 溶液 (1unit/μl) を 10μl 加え攪拌し、37°C の水浴中で酵素反応を開始させた。酵素反応の進行に伴い生成してきた o-アニシジン分解物の吸光度 (420nm) を経時的に測定し吸光度が一定となったところで酵素反応を停止して、その吸光度からガラクトース残基量を求め、ポリマー中の VLA 量を算出し共重合曲線を作成した。

2.4 モノマーの反応性比と共重合性の評価法

VLA と VGA、VLA と AAm の反応性比 (r) は曲線合致法、交点法、Fineman-Ross 法により算出され、VLA と VGA、VLA と AAm の共重合性が評価された。VLA と VGA の Q 値、 e 値は AAm の Q 値 (1.12)、 e 値 (1.19) および VLA と VGA、VLA と AAm の反応性比 (r) を基に算出された。

3 結果および考察

3.1 VLA と VGA、VLA と AAm の共重合性

VLA と VGA、VLA と AAm の共重合反応は、仕

込モノマーの比が大きく変化しない重合初期段階で停止するよう重合時間でコントロールされた。得られた poly(VLA-co-VGA)、poly(VLA-co-AAm) 中の VLA のガラクトース残基をガラクトースオキシダーゼによる酵素酸化反応によって定量し、ポリマー中の VLA (mol%) を算出して、共重合曲線を作成した (図 2、図 3)。得られた共重合曲線から曲線合致法でモノマーの反応性比を考察すると、図 2 (VLA の反応性比: r_1 、VGA の反応性比: r_2) において、 $r_1 > 1$ 、 $r_2 < 1$ となり、図 3 (VLA の反応性比: r_1 、AAm の反応性比: r_2) において、 $r_1 > 1$ 、 $r_2 < 1$ となることが明らかとなり、VLA の重合性は VGA、AAm の重合性に比べ高いことが示された。次に仕込モノマー比 ($F = [M_1] / [M_2]$) と、ポリマー中に取り込まれたモノマー比 ($f = d [M_1] / d [M_2]$) から交点法により反応性比を求めた。図 4 に poly(VLA-co-VGA)、図 5 に poly(VLA-co-AAm)

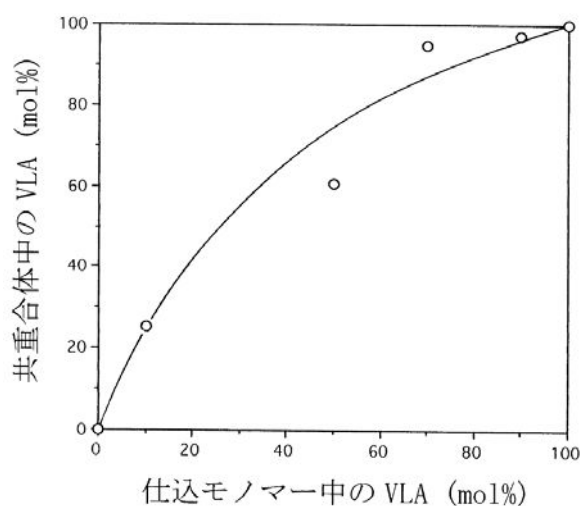


図 2 VLA と VGA の共重合曲線

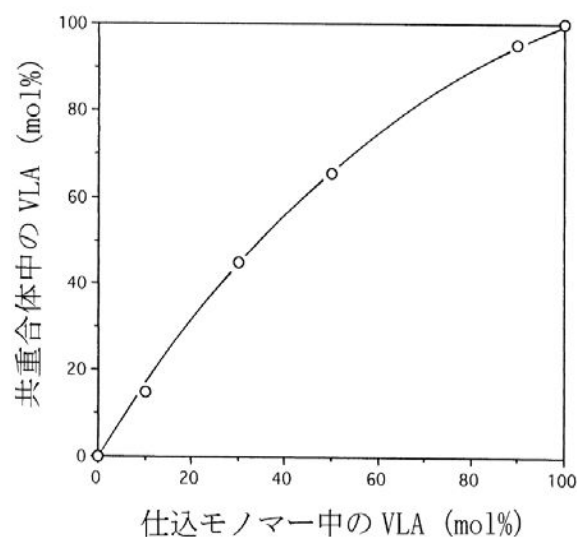


図 3 VLA と AAm の共重合曲線

の交点法の結果を示す。更に、図6に poly(VLA-co-VGA)、図7に poly(VLA-co-AAm)の Fineman-Ross 法の結果を示す。図4～図7の結果より反応性比を求めた。共重合曲線から曲線合致法で求められた反応性比と、交点法、Fineman-Ross 法によって求められた反応性比を表3、表4にまとめた。交点法、Fineman-Ross 法によって求められた反応性比は、共重合曲線から曲線合致法で求められた反応性比と一

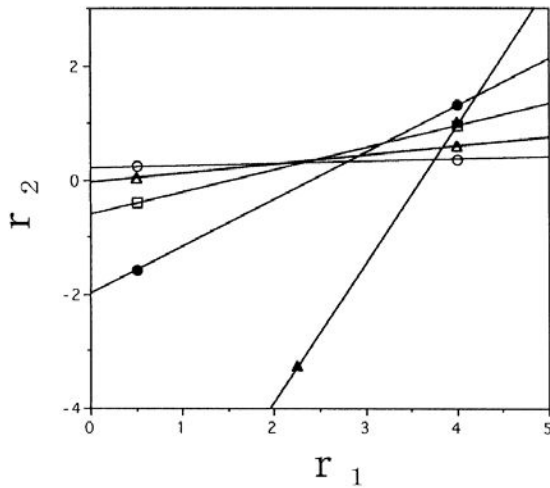


図4 poly(VLA-co-VGA)の交点法のプロット
(○) poly(VLA10-co-VGA)、(△) poly(VLA30-co-VGA)、(□) poly(VLA50-co-VGA)、(●) poly(VLA70-co-VGA)、(▲) poly(VLA90-co-VGA)

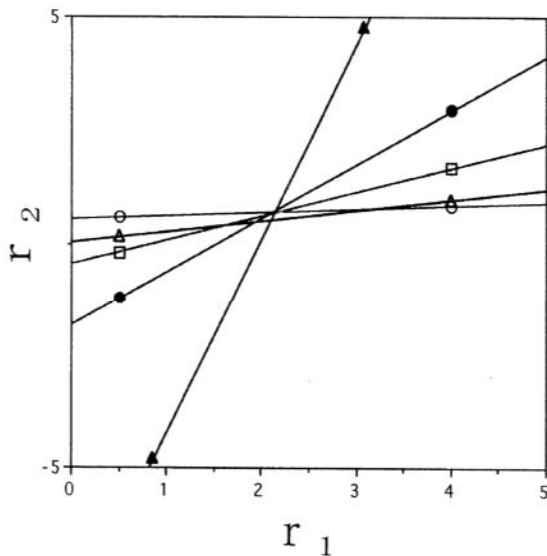


図5 poly(VLA-co-AAm)の交点法のプロット
(○) poly(VLA10-co-AAm)、(△) poly(VLA30-co-AAm)、(□) poly(VLA50-co-AAm)、(●) poly(VLA70-co-AAm)、(▲) poly(VLA90-co-AAm)

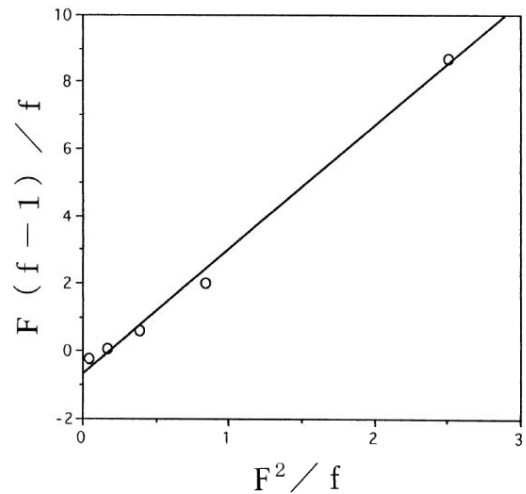


図6 poly(VLA-co-VGA)の Fineman-Ross 法のプロット

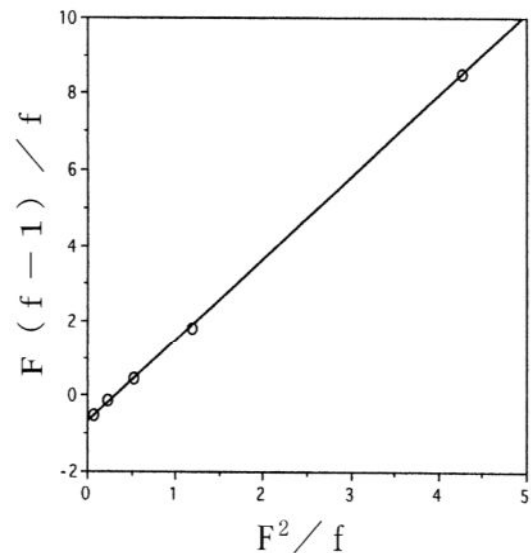


図7 poly(VLA-co-AAm)の Fineman-Ross 法のプロット

致した。また、poly(VLA-co-AAm)においては交点法により得られた $r_1 = 1.60 \sim 2.16$ 、 $r_2 = 0.30 \sim 0.76$ と Fineman-Ross 法により得られた $r_1 = 2.15$ 、 $r_2 = 0.67$ は特によく一致していた。表3より VLA と VGA の共重合反応について曲線合致法、交点法、Fineman-Ross 法のいずれにおいても r_1 は r_2 よりも大きいことから、VLA (r_1) は VGA (r_2) より共重合性が高いということが明らかとなった。また、表4より VLA と AAm の共重合反応について曲線合致法、交点法、Fineman-Ross 法のいずれにおいても r_1 は r_2 よりも大きいことから、VLA (r_1) は AAm (r_2) より共重合性が高いということが明らかとなった。

表 3 VLA(r_1) と VGA(r_2) のモノマー反応性比

反応性比算出法	r_1	r_2
曲線合致法	$1 <$	< 1
交点法	2.21~2.89	0.32~0.41
Fineman-Ross 法	3.68	0.67

表 4 VLA(r_1) と AAm(r_2) のモノマー反応性比

反応性比算出法	r_1	r_2
曲線合致法	$1 <$	< 1
交点法	1.60~2.16	0.30~0.76
Fineman-Ross 法	2.15	0.67

3.2 VLA と VGA の Q 値、e 値の算出

反応性比 (r_1 , r_2) は成長ポリマー鎖とモノマーの反応性によって決定される値である。この値を VLA、VGA モノマーのそれぞれ固有の値として算出できれば、VLA、VGA モノマーを用いた種々の共重合反応を考えるうえで非常に便利である。そこで、Alfrey と Price が提案したモノマー固有の値である Q 値 (モノマー共鳴因子) と e 値 (モノマーの極性因子) を算出した。その結果を表 5 に示す。一般にスチレンの Q 値 (1.0)、e 値 (-0.8) を基準にし、置換基による共鳴安定化が大きいと Q 値は大きくなり、置換基が電子供与性なら e 値は負の値を示し、電子吸引性なら e 値は正の値を示す。VLA、VGA の e 値

表 5 VLA と VGA の Q 値、e 値

モノマー	Q 値	e 値
AAm	1.12	1.19
VLA	a	1.97
	b	2.27
VGA	a-1	1.04
	a-2	0.57
	b-1	1.24
	b-2	0.64

は正の値となり、置換基が電子吸引性であることが明らかとなった。VLA、VGA 共にスチレン誘導体であるが、ラクトース、グルコースの側鎖がベンゼン環の存在を打ち消すほどの大きな影響を e 値に与えたことが示唆される。このことより VGA の e 値は a-2、b-2 の値が妥当であると考えられる。VLA の Q 値は、AAm、スチレンの Q 値より大きく、VLA は AAm、スチレンと比較して置換基による共鳴安定化が大きいことが明らかとなった。また、VGA の Q 値は 0.57~0.64 となり VLA、AAm、スチレンの Q 値より小さく、VGA は VLA、AAm、スチレンと比較して置換基による共鳴安定化が小さいことが明らかとなった。

4 結論

本研究では、poly(VLA-co-VGA)、poly(VLA-co-AAm)を様々なモノマー仕込比で重合し、重合初期段階の重合物を分析し、その共重合曲線よりモノマー反応性比を求めたが、poly(VLA-co-VGA)、poly(VLA-co-AAm)のいずれでも VLA の重合性が高いことが明らかとなった。更に Q 値、e 値が既知の市販モノマーであるアクリルアミド(AAm)と VLA、VLA と VGA の共重合挙動から VLA、VGA の Q 値、e 値が算出された。この Q 値、e 値を用いることで VLA、VGA を含む種々の有用な共重合体が効率良く分子設計され合成されることが期待される。特に VLA を含む共重合体においては、VLA 中の肝実質細胞に対して特異性のあるガラクトース残基の密度を高度に制御できる可能性が大いに期待される。また、VLA 中のガラクトース残基の 6 位のヒドロキシメチル基は、ガラクトースオキシダーゼにより選択的にアルデヒド基に変換され、種々の生理活性物質の固定化サイトとなることを考えると、インテリジェント化された固定化酵素基剤、実質細胞-ポリマー基剤ハイブリッドマテリアル、セルセパレーターなどへの応用が期待できる。

参考文献

- 1) 片岡一則：生命材料工学，裳華房，pp.53-81, 1991
- 2) 竹本喜一，砂本順三，明石満：高分子と医療，三田出版会，pp.140-155, 1989
- 3) 赤池敏宏，小林明，戸辺成四郎，武井由香，後藤光昭，小林一清：ハイブリッド人工肝臓の実用化への展望と課題，日本外科学会雑誌，92，pp.1272-1275, 1991
- 4) 小林一清，周曉華，住友宏，岡田鉦彦，赤池敏

- 宏：ラクトース誘導体を側鎖にもつポリペプチドの合成, 高分子論文集, 48, pp.253-256, 1991
- 5) 後藤光昭, 赤池敏宏：細胞認識性分子の設計とターゲット療法への応用, CURRENT THERAPY, 10, pp.44-52, 1992
- 6) 後藤光昭, 赤池敏宏：細胞認識性分子を有する超分子集合体型薬物運搬体の設計とターゲット療法への応用, 化学と工業, 45, pp.2052-2054, 1992
- 7) 福留功博, 丸山厚, 赤池敏宏：トロンビン固定化高分子材料の合成とその表面上での内皮細胞の挙動解析, 都城工業高等専門学校研究報告, 33, pp.35-41, 1999
- 8) K. Kobayashi, H. Sumitomo, Y. Ina : Synthesis and Functions of Polystyrene Derivatives Having Pendant Oligosaccharides, Polymer J., 17, pp.567-575, 1985