

特集 水と高分子

生体適合性と水和

Correlation between Biocompatibility of Polymer Materials and Their Hydration Structure

北野博巳*・源明 誠

Hiromi KITANO* and Makoto GEMMEI-IDE

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama

E-mail: kitano@eng.u-toyama.ac.jp*

生体適合性の発現機構について、多くの議論がなされてきたが、未だ解決をみない。本稿では、振動分光法および示差走査熱量法に基づき評価された材料の水和構造から材料の生体適合性を観た。

Abstract: The origin of biocompatibility of materials has been discussed by many researchers, but not clarified yet. In this mini-review, the correlation of biocompatibility of polymer materials and its hydration structure examined by vibrational spectroscopy and differential scanning calorimetry was discussed.

Keywords: Water Structure / Ionic & Nonionic Polymers / Vibrational Spectroscopy / Differential Scanning Calorimetry

1. はじめに

「生体適合性」と「水和」は、前者は主に生物学、後者は物理化学において研究対象とされてきた。水は生体適合性が発現する場ではあるが、媒質としてであり、水分子そのものはなんら生理活性を持たない。一方生体適合性は、細胞の接着、その後続く伸展・分化などの生体反応に関する事象をも含んでいる。これらの反応で、水が何らかの機能を持つかのように議論することはできない。しかしながら、生体反応が生じる以前の生体物質の接着のみを考えれば、物理化学の問題として扱うことが可能であり、水和と生体適合性とを繋ぎ議論ができる。本稿では、生体適合性を生体物質の接着を誘起しない性質を指すこととし、生体適合性を有するといわれる材料中あるいは表面における水の構造を、非適合材料のそれと比較し、水和構造と生体適合性が、どこまで相関のある事象として扱えるのかをまとめた。

2. 水和構造

水和構造は、溶質あるいは固体表面の官能基およびそれら周辺の水分子間で形成される水素結合を含めた多分子からなる三次元構造を指す。三次元構造という言葉からは、結晶構造など静的な原子配置が想像されるが、水和構造の場合は、 10^{-7} – 10^{-13} s 程度の間隔で

原子配置（分子配向）が変化するものを指す。純水では、 10^{-12} s 程度で分子間水素結合の組み換えが起き、回転・並進運動の平均的な時間間隔 (τ_D) は 10^{-11} s 程度である。これは、観測時間 (τ) により、得られる分子像が異なることを意味する。時間を考慮した分子像のことを動的構造という¹⁾。水分子の平均位置における振動間隔 τ_V (10^{-13} s) と τ_D を基に、水の動的構造は、*I* 構造 ($\tau < \tau_V$)、*V* 構造 ($\tau_V < \tau < \tau_D$)、*D* 構造 ($\tau_D < \tau$) に分類され、それぞれ、瞬間的な像、振動は平均化されているが位置・配向の情報を持った像、位置・配向が平均化された像を指す。種々ある水和構造の評価法は、原理に基づく固有の τ を有しており、手法が何れの像を与えているのかに留意しなければならない。

3. 水和構造の評価法とその分類

代表的な評価法として、*D* 構造を与える示差走査熱量法 (DSC)・核磁気共鳴法・誘電緩和法、*V* 構造を与える振動分光法 (VS) (赤外・ラマン) が挙げられる。系に熱摂動を与え水和構造を探る DSC 法以外はいわゆる分光法であり、*in situ* 測定が可能である。本稿では、DSC および VS 法による報告を中心に述べる。

DSC 法は、熱流束を伴う相転移をプローブとし、その温度の違いから水和構造が議論される。図1 (A) に高分子-水系の DSC 曲線を例示した。発・吸熱ピーク



北野博巳 Hiromi KITANO

富山大学大学院理工学研究部
[930-8555] 富山市五福 3190
教授, 工学博士.
専門は高分子界面科学. (写真左)

源明 誠 Makoto GEMMEI-IDE

同左

助教, 博士 (工学).
専門は高分子界面科学. (写真右)

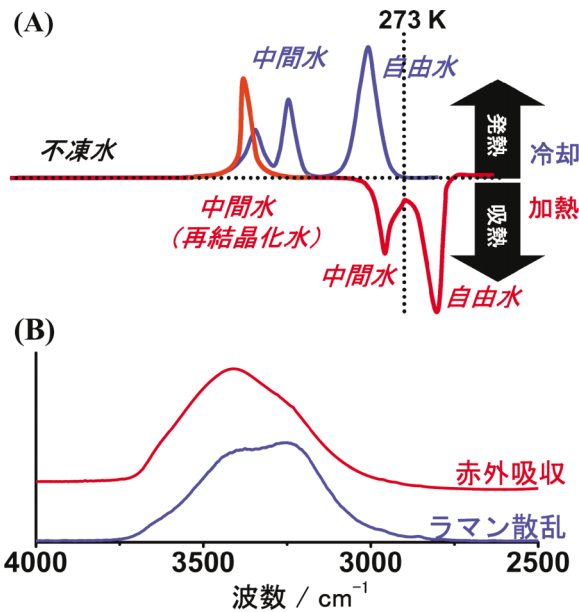


図1 (A) 水-高分子系のDSC曲線, (B) 水の赤外・ラマンOH伸縮振動スペクトル

は、水の結晶化・融解と解釈され、高温側から自由・中間水と呼ばれることが多い。中間水のうち昇温過程で結晶化する水は、再結晶化水と呼ばれ区別される。また、水の固液相転移モルエンタルピーが温度に依らず一定として結晶化水の量を算出し、実際的水分量との差から不凍水量が見積もられる。多くの場合、自由・中間・不凍水の比率をもとに議論がなされてきた。

VS法は、分子振動をプローブとして、水のOH伸縮振動帯の波形あるいは成分分離から、水和構造を議論する。図1 (B) に純水のOH伸縮振動赤外・ラマンスペクトルを示す。スペクトルは、3250と3400 cm⁻¹に主要成分を持つが、前者を氷I_hに類似の水素結合ネットワーク構造を持つ水、あるいは水分子間で強い水素結合をした水、後者を歪んだ水素結合をした水あるいは弱い水素結合をした水、と呼ぶことが多い。VS法においては、材料中あるいは表面の水の波形が純水のそれと似ているのか、あるいは3250 cm⁻¹の成分比から、水分子間水素結合ネットワーク構造が、純水と比較してどの程度壊されているかを検討することが多い。

DSC法で分類される水和構造は、自由・中間・不凍水であり、VS法では、純水の水素結合ネットワーク構造に似ているか否かである。共に水和構造の具体的な三次元構造(配置)を示すものではなく、純水中における水との違い、すなわち、DSC法では相転移温度を、またVS法では波形の違いにより水和構造が表現される。ここで注意しなければならないのは、後述の非線形光学現象を利用した和周波発生(SFG)分光法以外は、材料中の水が観えるだけで、界面の水を選択的に評価できないという点である。バルク中の水の動態から、界面の水和構造を推し量っているのが現状である。

表1 種々の高分子のN_{corr}値

高分子	N _{corr} 値
アニオン・カチオン	
Poly(acrylic acid)	2.3
Poly[N-3-(dimethylamino)propylmethacrylamide]	3.6
Sodium poly-L-glutamate	4.6
Sodium poly(ethylene sulfonate)	5.0
Polyallylamine hydrochloride	5.1
Poly-L-lysine hydrobromide	5.4
Sodium polyacrylate	5.9
両性イオン	
MPC	-0.7
SPB	2.5 (m=0.66) 2.1 (m=0.89) 1.2 (m=0.95)
SBB	2.5 (m=0.63) 2.1 (m=0.68) 0.7 (m=0.83)
CMB	-0.27
CEB	-
PMD	5.1 (m=1) 0.7 (m=0.53) 6.0 (m=0)

4. 荷電高分子

荷電高分子はカチオン・アニオン・両性イオン型に大別され、両性イオン型はアニオンおよびカチオン性モノマーからなる共重合体と両性イオン型モノマーからなる重合体とに区分される。これらは水を溶媒とすることから、生体適合性の評価では、水を非溶媒とするコモノマーとの共重合体として、または表面グラフトによる高分子ブラシとして用いられる。また、金基板表面に構築されるチオールあるいはジスルフィド誘導体の自己組織化単分子膜(SAM)をモデルとして、荷電表面の生体適合性が評価されている^{2),3)}。

生体適合性は、共重合体、高分子ブラシ、SAMの違いに依らず、両性イオン型>アニオン・カチオン性高分子 (SAM) とされる。両性イオン型高分子として、ホスホベタイン型の MPC^{4),5)}, スルホベタイン型の SPB^{6)~8)}, SBB⁸⁾, カルボキシベタイン型の CMB^{9)~11)}, CEB^{12),13)} が知られている (表1)。

両性イオン型高分子は、電解質であるにもかかわらず、純水の水素結合ネットワーク構造を攪乱しないことが当該水溶液の OH 伸縮振動ラマンスペクトルの偏光解析から明らかにされた^{9),14)~16)}。偏光ラマン測定は、水素結合でカップリングした OH 伸縮振動子の集合的振動成分を分離し、この成分強度を基に高分子鎖による水分子間水素結合の欠損数 (N_{corr}) を評価できる (表1)。 N_{corr} 値が大きな正の値をとるほど、水構造を乱すことを意味する。アニオン・カチオン性高分子は水の構造を強く破壊するのに対し、両性イオン型では相対的には抑制されている。水構造の保持が両性イオン基に依拠することは、PSPB, PSBB の四級化度 (m) の増加に伴う N_{corr} 値の減少により明確に支持される¹⁴⁾。さらに、Methacrylic acid-*N,N*-dimethylaminopropyl methacryl amide 共重合体 (PMD) の N_{corr} 値は、共重合比約 1 : 1 で極小を示し¹⁶⁾、生体適合性はそのとき最も良好であった¹⁷⁾。

Gragson らは、SFG 分光法で、アニオン (Sodium dodecyl sulfate, SDS), カチオン (Dodecylammonium chloride, DAC) および両界面活性剤 (50 : 50) からなる Langmuir 膜界面の水について評価している^{18),19)}。SFG スペクトルは、赤外スペクトルの解釈に準ずるが、非対称中心を持つ分子のみの情報を与えることが特徴である。単一成分のみの系では、純水と同じように 3600 - 3000 cm^{-1} に成分が観測され、SDS : DAC = 50 : 50 の系では観測されなかったと報告されている。これは、電荷に偏りのある界面では電縮作用により水分子の吸着層が形成されるのに対し、電荷中和された界面では形成されないことを示す。この結果を、両性イオン界面の水和圏が極めて小さいと解釈するならば、上述の高分子水溶液中の水構造に関する知見と良く一致する。

Ishihara らは、MPC の生体適合性に関する報告と共に、MPC と *n*-butylmethacrylate (BMA) のモル比約 3 : 7 の共重合体中の水構造を DSC 法により評価し、当該材料中の水の 84wt % が自由水であると報告している⁵⁾。モノマーを BMA とした acrylamide あるいは *N*-vinylpyrrolidone との共重合体と Poly (2-hydroxyethylmethacrylate) (PHEMA) 中の自由水量は、いずれも 40 wt % 程度と MPC より大幅に少ないことを根拠に、生体適合性の発現駆動力は、自由水にあると結論付けている。DSC 法で分類される自由水が、純水の水構造と同じであることを指すならば、上述のラマン分光法および SFG 分光法の知見と矛盾しない。

上述のように、荷電高分子のうち生体適合性に優れるとされる両性イオン型高分子あるいは単分子膜表面は、VS, SFG 法あるいは DSC 法などの手法の違いに依らず、他の材料 (表面) と比べて水和水和圏が小さいという共通した結果が得られている。両性イオン型高分子の水和圏がアニオン・カチオン高分子よりも小さいことは、高分子イオンコンプレックス形成が、脱水和によるエントロピー駆動であることとも矛盾しない²⁰⁾。注目すべき点は、MPC のように生体由来物質を模倣することが、生体適合性の発現にとって必ずしも重要ではないことであり、荷電高分子については、水の構造に対して不活性な、つまり水和水和圏が小さく水の構造を破壊しない材料が高い生体適合性を発現するといえる。

5. ノニオン高分子

ノニオン高分子の Poly (ethylene glycol) (PEG) および Poly (2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) は、生体適合性の評価だけではなく、これら材料中の水和水和圏についても多くの報告がなされている。PEG は両親媒性材料であることから、適合性評価の際には、オリゴエチレングリコール SAM 膜が用いられている²¹⁾。

DSC 法により、PEG²²⁾ および PMEA²³⁾ は、昇温過程で結晶化する再結晶化水 (中間水) を有することが報告されている。この水は、PEG, PMEA に特有なものではないが稀な例である^{24),25)}。特に PMEA は、他の材料が水溶性であるのに対し、水を溶媒としないという点で特異である。Tanaka らは、種々の組成比からなる HEMA-MEA 共重合体²⁶⁾ および種々のポリ (メタ) アクリレート²⁷⁾ 中の水和水和圏と生体適合性を評価し、再結晶化水の比率が高いほど適合性に優れることを示し、生体適合性の発現にはこの水が鍵になるとしている^{26)~28)}。Tanaka らは積極的に述べていないが、不凍水が少ないのも特徴である。この点は先にあげた MPC も同じであるが、医用材料として用いられている MPC と BMA の共重合体が再結晶化水を持つとの報告は今のところない。

再結晶化水は、Bovine serum albumin²⁵⁾, Cytochrome c (Cyt c) などのタンパク質水溶液においても確認されており、特に興味深いのは、天然 Cyt c では観られるが、変性 Cyt c にはないとする Green らの報告である²⁹⁾。変性前後におけるタンパク質表面の官能基分布は明らかではないが、天然タンパク質を広義の両性イオン型高分子として捉えれば、前述の両性イオン型高分子はいずれも再結晶化水を有する可能性が高いと考えられる。

Ide ら³⁰⁾ および Morita ら³¹⁾ は、全反射赤外分光法により、室温における PMEA 中の水和水和圏を評価し、再結晶化水の V 構造または赤外スペクトル成分の帰属を試みている。Ide らは、再結晶化水が存在しない低含水域と存在する高含水域を比較し、後者が純水のスペクトルと類似していたことから、再結晶化水の構造

は純水のそれと同じであること、またPMEA鎖の水和圏は極端に小さく、これにより微小空間に閉じ込められた水が再結晶化を起こすと解釈した。一方Moritaらは、水接触後の時間分解スペクトル測定では、初期における変化が 3400 cm^{-1} の成分増加のみであったことから、この成分を再結晶化水に帰属した。両者の再結晶化水に関する主たる見解は異なるが、他の高分子材料と比べて、PMEA鎖が水分子間水素結合をあまり乱さない、または水分子を強く束縛しないと解釈する点は共通している。

6. 振動分光法から見た水の相転移挙動

3節で述べたように、DSC法とVS(赤外, ラマン, SFG)法により得られる水と構造は、動的構造(I , V , D 構造)の観点からも、プローブとする物理化学現象も異なる。4, 5節で考察したDSC法とVS法による水と構造のすり合わせが試みられているが、解釈のみであり、実験的検証は少ない。最近GemmeiとKitanoは、固体高分子中に含まれる少量の水の相転移挙動を赤外分光法により評価し、DSC法に基づき解釈されている水の相転移挙動の一部に修正が必要となる例があることを報告した^{32)~34)}。低含水のポリスチレン(PS)においては、室温では単分子状態で存在する水が冷却に伴い液化し、水の過冷却限界温度付近で結晶化すること、さらに、蒸着・昇華である固-気相転移により、氷の成長・縮小が生じることが示された³²⁾。これらの相転移は、DSC曲線において発・吸熱ピークとして観測されると予測されるが、DSC法においては、一般的に液体(水)と固体(氷)間の相転移と解釈されている。さらに、高い冷却速度では、PMEAと同様に、昇温過程で氷の成長が生じることが示された³³⁾。水の再結晶化は、PMEAに限らずアモルファス氷の結晶化と解釈されている^{22)~28)}、PSで観測されたものは、蒸着が主な経路であることが示された。GemmeiとKitanoは、PMEA中の水の相転移についても評価し、DSC法により再結晶化が確認されている下限含水域²³⁾の再結晶化が、液化を経ずに蒸着成長した氷であることや、冷却速度により再結晶化する水の量が大きく変化することを示した³⁴⁾。これらの結果は、低含水域での熱擾動に対する水の動態の一般解釈に再考を求めるものである。

7. まとめ

生体適合材料とされる荷電高分子およびノニオン高

分子の水と構造について、DSC法およびVS法に基づいた研究を紹介した。いずれの系においても非適合材料と比べ、当該材料は、水分子間水素結合をあまり乱さない、あるいは水分子を強く拘束しない特性を有しているといえそうである。しかしながら、評価法の本質的な違いから、DSC法とVS法において見えてくる水と構造を、全く同じ言葉で表現すると混乱が生じる恐れがある。現段階においては、ある特定の評価法により表現されるある特定の水と構造を、材料の生体適合性と普遍的な相関があるものとみなすには、いますこし情報の蓄積が必要ではないかと考えている。

文 献

- 1) D. Eisenberg and W. Kauzmann, "The Structure and Properties of Water" Clarendon Press: London, 1969.
- 2) R. E. Holmlin, et al.: *Langmuir*, **17**, 2841 (2001)
- 3) J. Tien, et al.: *Langmuir*, **13**, 5349 (1997)
- 4) T. Nakaya and Y. J. Li: *Prog. Polym. Sci.*, **24**, 143 (1999)
- 5) K. Ishihara, et al.: *J. Biomed. Mater. Res.*, **39**, 323 (1998)
- 6) J. Yuan, et al.: *Polym. Int.*, **52**, 1869 (2003)
- 7) Y. Yuan, et al.: *Polym. Int.*, **53**, 121 (2004)
- 8) H. Kitano, et al.: *Macromol. Biosci.*, **5**, 314 (2005)
- 9) H. Kitano, et al.: *Langmuir*, **21**, 11932 (2005)
- 10) K. Matsuura, et al.: *Macromol. Chem. Phys.*, **208**, 862 (2007)
- 11) S. Tada, et al.: *Macromol. Biosci.*, **9**, 63 (2009)
- 12) Z. Zhang, et al.: *Langmuir*, **22**, 10072 (2006)
- 13) Z. Zhang, et al.: *Biomacromolecules*, **7**, 3311 (2006)
- 14) H. Kitano, et al.: *J. Phys. Chem. B*, **104**, 11425 (2000)
- 15) H. Kitano, et al.: *J. Phys. Chem. B*, **106**, 11391 (2002)
- 16) H. Kitano, et al.: *J. Colloid Interface Sci.*, **313**, 461 (2007)
- 17) H. Kitano, et al.: *Macromol. Biosci.*, **8**, 77 (2007)
- 18) D. E. Gragson, et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 6144 (1997)
- 19) D. E. Gragson, et al.: *J. Phys. Chem. B*, **102**, 3847 (1998)
- 20) J. B. Schlenoff, et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 13589 (2008)
- 21) K. L. Prime, et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 10714 (1993)
- 22) T. Hatakeyama, et al.: *Thermochimica Acta*, **465**, 59 (2007)
- 23) M. Tanaka, et al.: *Polym. Int.*, **49**, 1709 (2000)
- 24) A. P. MacKenzie: *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B*, **278**, 167 (1977)
- 25) F. Franks: "In Water: A Comprehensive Treatise"; F. Franks Ed.; Plenum Press: New York, 1982; Vol. 7.
- 26) M. Tanaka, et al.: *Biomacromolecules*, **3**, 36 (2002)
- 27) M. Tanaka and A. Mochizuki: *J. Biomed. Mater. Res.*, **68A**, 684 (2004)
- 28) E. Hirota, et al.: *J. Adv. Sci.*, **17**, 245 (2005)
- 29) J. L. Green, et al.: *J. Phys. Chem.*, **98**, 13780 (1994)
- 30) M. Ide, et al.: *Langmuir*, **19**, 429 (2003)
- 31) S. Morita, et al.: *Langmuir*, **23**, 3750 (2007)
- 32) M. Gemmei-Ide and H. Kitano: *J. Phys. Chem. B*, **112**, 2764 (2008)
- 33) M. Gemmei-Ide and H. Kitano: *J. Phys. Chem. B*, **112**, 13499 (2008)
- 34) M. Gemmei-Ide and H. Kitano: *J. Phys. Chem. B*, **112**, 12863 (2008)