(1997年3月15日受付・1997年6月15日受理)

ポリアミノ酸-ポリイソプレンブロック膜の酵素分解

日本合成ゴム㈱ 吉田淑則・山川芳孝・後藤幸平
大阪府立大学先端科学研究所 岡 勝仁・林 壽郎Physical and Biodegradation Properties of A-B-A Type Block Copolymer
Membranes Consisting of Poly(N-hydroxypropyl-L-glutamine)
as the A Component and Polyisoprene as the B ComponentYoshinori Yoshida^{*1}, Yoshitaka Yamakawa^{*1}, Kouhei Gotoh^{*1},
Masahito Oka^{*2} and Toshio Hayashi^{*2}^{*1}Japan Synthetic Rubber Co., Ltd., Chuo-Ku, Tokyo 104, Japan^{*2}Research Institute for Advanced Science and Technology, Osaka Prefecture University, Sakai-shi,
Osaka 593, Japan

Abstract: A-B-A type block copolymer [GIG(P)] membranes consisting of Poly (N-hydroxypropyl-L-glutamine) [PHPG] as the A component and Polyisoprene [PI] as the B component were prepared by carrying out aminoalcoholysis reaction with 3-amino-1-propanol [P] together with a crosslinking reaction with 1,8-octamethylene diamine (OMDA) on membranes of the starting block copolymer [GIG] membranes consisting of poly (γ -benzyl L-glutamate) [PBLG] and PI. It was shown that the effective crosslink density was proportional to the molar % of OMDA in the reaction mixture. The relation between their bulk structure and membrane properties was investigated, such as the swelling ratio q in a pseudo-extracellular fluid [PECF], tensile properties, and enzymatic degradation behavior of the membranes in PECF. Tensile properties of the hydrophilic membranes were highly dependent on q in PECF, and on the hydrophobic portions in molecular chains, whose behavior was typical of an elastomer. Biodegradation of samples in vitro by ficin indicated that the degradation was a bulk rather than a surface phenomenon, and that the rate of degradation was also highly dependent on q of membranes in PECF.

(Received 15 March, 1997 ; Accepted 15 June, 1997)

1. 緒 言

合成ポリアミノ酸は、その骨格鎖がタンパク質などの天然ポリアミノ酸と同じくペプチド結合から構成されているため、生体組織に対する親和性が高く、また多くのポリアミノ酸は生体に対して抗原性を示さないことが明らかにされているため、適切な親水性を付与させたポリアミノ酸を合成すれば、医療用材料としての有用性が期待できる。たとえば、火傷や外傷に対する皮膚代替材料、外科手術後の癒着防止用隔膜材料、あるいは徐放性医薬用高分子担体としての応用が考えられる[1]。このような観点から、種々のタイプの合成ポリペプチドハイドロ

ゲル膜の分子設計が試みられ、膜の膨潤度、水分透過性、力学的性質をはじめプロテアーゼ酵素による膜の酵素分解特性および生体親和性などの研究が報告されている[2-5]。一方、ポリイソプレンと類似構造をもつ天然ゴムは柔軟性に富み、物理的性質に優れているため、すでに医療分野で利用されている。しかしながら、生体適合性に問題があり、血液と接触する部分には使用できない。そこで、両者の特性を補償した新規な親水性ポリマーとして、天然ゴム類似構造をもつポリイソプレンをミドルブロック成分として、その両末端に生体を構成するタンパク質の構造に類似した親水性の合成ポリアミノ酸を結合させたA-B-A型ブロックポリマーの分子設計を試みた。

これら両ブロック成分は相溶化しないためマイクロ相構造を発現し、血液適合性にも優れることが報告されている[6-10]。

本研究では、優れた生体適合性を持ちマイクロ不均一相構造を発現する新しいハイドロゲル膜素材の開発を目指し、ポリイソプレン(I)をミドルブロック成分とし、その両端にポリ(N-ヒドロキシプロピル-L-グルタミン)(G(P))をブロック成分としたA-B-A型ブロックポリマー(GIG(P))を合成した。GIG(P)は、まず最初にポリ(γ-ベンジル-L-グルタメート)(PBLG)とPIとからなるGIGブロックポリマーを合成し、適当な厚みをもつキャスト膜を調製した後、橋かけ剤としてのオクタメチレンジアミン共存下で3-アミノ-1-プロパノール(P)で側鎖末端置換反応を行って合成した。次いでGIG(P)膜中の分子構造と膜性能との相関性を明らかにするため、模擬生体液(PECF)中での膜膨潤度と力学的性質およびフィシン酵素分解挙動について検討した。

2. 実験方法

2.1 合成

両末端アミノ基付与ポリイソプレンの合成：ミドルブロック成分の両末端アミノ基付与ポリイソプレン(ATPI)はFig. 1の通りに合成した。すなわち、1,3-ジイソプロペニルベンゼン(0.6g)、シクロヘキサン(150ml)、トリエチルアミン(0.04g)、1.1N-secブチルリチウムシクロヘキサン溶液(7.0ml)の混合系中にイソプレン(20.0g)を添加し、

Fig. 1 Schematic diagrams of the preparation of amine terminated polyisoprene(ATPI)

6時間攪拌して重合させた。この反応液に、2,2,5,5-テトラメチル-1-(3-プロモプロピル)-アザ-2, 5-ジシラシクロペンタン(3.5g)を添加し、15時間攪拌して反応させた後、イソプロパノール/メタノール(3/1,v/v)混合溶液(2L)中に添加して重合体を沈殿させた。これをトルエンに溶解し、上記混合溶液中で重合体を再沈殿させて精製した。室温で溶媒を揮散させた後、減圧下で十分乾燥し、重合体約13.5gを得た。

GIGブロックポリマーの合成：ポリアミノ酸ブロック成分として、L-グルタミン酸-γ-ベンジル-N-カルボキシン酸無水物(BLG-NCA)粗結晶は味の素㈱から恵贈された。これを酢酸エチル/石油ベンジン系で精製、乾燥した後、所定量をジオキサン/塩化メチレン(1/1,v/v)混合溶媒中に溶解させ、さらに所定量のATPIを加えて、暗所で25°C、48時間重合反応させた。反応液をメタノール中に投入して重合体を沈殿させ、室温、減圧下で十分乾燥させてGIGブロックポリマーを得た。ポリマーの精製は、まず未反応のATPI成分を除去するために、ヘキサンによる抽出を行い、次いで微量に残存するBLG-NCAおよびBLGオリゴマーを除去するために、塩化メチレン/ヘキサン混合系で再沈殿を繰り返すことで精製ポリマーを得た。同様の操作でATPI/BLG-NCA量比の異なるGIGブロックポリマーを4種類合成した。

GIG(P)膜の調製：GIGブロックポリマーをクロロホルム溶液よりキャストして厚さ50~100μmの膜を調製し、橋かけ剤としてオクタメチレンジアミン(OMDA)の共存下で、3-アミノ-1-プロパノール(P)中に膜を浸漬させ、58~60°Cで48時間反応させた。反応後、得られたGIG(P)膜をエタノール、水、エチルエーテルで順次洗浄することにより精製した。反応後の膜について赤外吸収スペクトル測定を行い、フェニル核の特性吸収帯(700,750cm⁻¹)とエステル結合(1730cm⁻¹)の完全な消失を確認した。膜試料はエタノール中に浸漬し保存した。一連の反応をFig. 2に示す。比較検討のためにポリ(N-ヒドロキシプロピル-L-グルタミン)(PHPG)膜も同様に調製した。

2.2 測定

分子量および共重合組成：ATPIの分子量はGPC測定から、アミノ基の含量は酢酸中での過塩素酸滴定法により推定した。GIGブロックポリマーの分子量はクロロホルム中でのGPC測定から求めた。Table 1に、得られたGIGブロックポリマーの分子量、共重合組成およびPIの分子量を示す。

GIG(P)膜の水膨潤度：生体内条件を考慮して、本研究では全て模擬生体液(PECF)を使用し、37°C、pH7.4の条件下での膜の膨潤時および乾燥時における重量(W_wおよびW_d)を測定することから式(1)により膜の膨潤度qを算

Fig. 3 The swelling ratio (q) of PECF by membranes at 37°C as a function of the molar percent of OMDA for; (1) PHPG-1, (2) GIG(P)-1, (3) GIG(P)-2, (4) GIG(P)-3, and (5) GIG(P)-4

は $-3/5$ となっている。Floryは、充分大きな膨潤度を与える等方性高分子鎖の網目構造の平衡膨潤度を評価する近似式を理論的に導いているが[11]、さらに単純化することにより、最終的に平衡膨潤度 q_m と架橋度 f_c との間に式(2)が導かれる。

$$q_m^{5/3} = (\nu K / V_1) (1/2 - \chi_1) / f_c \quad (2)$$

ここで、 ν は高分子の分子容、 K はある定数、 V_1 は溶媒のモル容積、 χ_1 は高分子-溶媒相互作用パラメーターを表す。式(2)を対数表示すると式(3)が得られる。

$$\log q_m = -3/5 \log f_c + 3/5 \log [(\nu K / V_1) (1/2 - \chi_1)] \quad (3)$$

式(3)は、 $\log q_m$ が $\log f_c$ に対して $-3/5$ の傾きをもつ直線で与えられることを示している。本実験系では f_c 値を直接評価できないが、PHPG膜について実験で得られた傾き $-3/5$ と式(3)とを対比させることによりハイドロゲル膜の f_c がOMDA濃度に比例していると思ふことができる。他方、Fig. 3で、GIG膜の q 値がPHPG膜の場合より小さくなっているのは、ミドルブロック成分の疎水性効果によるものと推定される。

3.2 膨潤膜の力学特性

比較的膨潤度の小さなポリアミノ酸膜は、他の合成高分子膜と同様に、引張試験による応力-歪曲線は特徴的な降伏点をもつ典型的な可塑性膜の冷延伸挙動を示すが[12]、高膨潤度膜はエラストマー的挙動を示すことが報告されている[13]。Fig. 4には、それぞれの膨潤膜の引張り試験で得られる応力-歪曲線の例を示す。高膨潤度膜の引張り挙動は、応力-歪曲線の形から、いわゆる下に凸の皮膚型

Fig. 4 Stress-strain curves of membranes at 25°C in PECF for; (1) PHPG-12, (2) PHPG-13, (3) GIG(P)-11, (4) GIG(P)-21, (5) GIG(P)-31, and (6) GIG(P)-41.

と緩いS字形のエラストマー型に分類される[14]。PHPG-1膜では、延伸率の低い領域では下に凸の曲線が観測され、生体の皮膚や血管の力学挙動に類似したものであるが、延伸率が高くなると強度が不十分なまま破断しており、素材としては有用性に欠ける。それに対して、ミドルブロックにPI成分をもつGIG(P)膜ではエラストマー的挙動を示すが、素材としてはより有用と考えられる。これは、PIブロック成分の疎水性が膜の力学的性質に影響して大きな力学的パラメーターの値を与えたものと考えられる。Table 3に、それぞれの膜について引張試験から求められた力学パラメーターの値をまとめた。表の中で、Sample Codeの2桁数字の右端の数字はOMDA組成(モル%)を表

Table 3 Tensile properties of membranes at 25.0°C in PECF

Sample Code	q (W_w / W_d)	E (MPa)	σ_B (MPa)	ϵ_B (%)
PHPG-12	10.4	0.21	0.88	98
PHPG-13	8.2	0.46	1.26	103
PHPG-14	6.8	0.75	1.55	108
GIG(P)-11	12.0	1.90	3.80	155
GIG(P)-21	10.8	2.55	4.85	158
GIG(P)-31	9.2	2.95	4.90	130
GIG(P)-41	8.0	4.20	6.50	123

示している。

Table 3で、架橋度(すなわちOMDAモル組成)の異なるPHPG膜についてみると、架橋度の増大に伴って膨潤度が低下し、それに伴い力学性能が高まる傾向が示されている。他方、GIG(P)膜の場合は、PHPG膜よりも低い膨潤度でも柔軟性に富むことが示される。

3.3 フィシンによる膨潤膜の酵素分解

創傷などによる炎症部位において産生される種々のプロテアーゼの中で、エンドペプチダーゼとしてカテプシンBがある[15]。本研究では、カテプシンBと類似のポリペプチド加水分解挙動を示す酵素として植物由来のチオール型エンドペプチダーゼであるフィシンを選んだ。

Fig. 5はGIG(P)-11膜およびPHPG-12膜について、それぞれ酵素分解後の残存重量の相対値(W_r/W_0)およびその時点での膜の q 値の時間依存性を実測した例を示す。フィシンの分子量は約26,000であるが、本研究で用いた試料膜はいずれも q 値が大きいので、フィシン分子が膜表面だけでなく、高分子膜のネットワーク内部にまで侵入するものと考えられる。Fig. 5で、膜重量がまだ大きく減少しない反応初期段階で、 q 値が直ちに増加することが認められるが、このことから、フィシンによる膜の分解が、表面反応のみでなく、むしろ膜全体でのバルク反応で進行することが示唆される。

Fig. 5に示されるように、膜の重量減少は直線的でなく、分解初期ではゆるやかに減少し、その後次第に減少の割合が増していく。これは、エンドペプチダーゼであるフィシンが、基質高分子ネットワークを加水分解して、

Fig. 5 Dry weight ratio (W_r/W_0) and swelling ratio (q) of membranes in PECF as a function of ficin digestion time (h) at pH 7.4 and 37.0°C for; (1) PHPG-12 and (2) GIG(P)-11

Fig. 6 Dry weight ratio (W_r/W_0) and the relative tensile strength at break ($\sigma_{r,B}/\sigma_{0,B}$) of membranes as a function of ficin digestion time (h) at pH 7.4 and 37.0°C in PECF for; (1) PHPG-12 and (2) GIG(P)-11

水に可溶な分子鎖断片を生成するためには、2ヶ所を切断する必要があるためと考えられる。他方、膜の q 値は分子鎖の1ヶ所切断によって増大することになる。

GIG(P)-11とPHPG-12の分解挙動を比較すると、前者は残存膜重量が35%以上の領域でも膜の形状を保持しているのに対して、後者ではそれが50%のところで膜形状が大きく破壊されていた。このことは、ブロックポリマー膜はPIブロック成分のミクロ不均一構造の存在により、相当するホモポリマー膜より耐久性が増していることを示唆している。

生分解性膜材料として実際に医療応用する場合、膜が分解を受けていく過程で膜として十分な力学性能がどの程度まで維持されるかを正確に知ることが重要である。Fig. 6は、GIG(P)-11およびPHPG-12膜について、フィシンによる酵素分解時間に対する膜の残存重量の相対値(W_r/W_0)と残存強度の相対値($\sigma_{r,B}/\sigma_{0,B}$)の変化を求めた結果を示す。図から明らかなように、膜の重量減少に比べて強度減少が著しく、酵素分解に伴って膜中での架橋点が切断されることにより膜の破壊が生じていくことが示唆される。実用に際しては、膜の分解速度を求めるだけでなく、膜が実質的な役割を果たすことのできる寿命を明確に把握することが大切であろう。

Fig. 7は、それぞれの試料膜について、同一条件下でフィシンによる酵素分解の実験結果より、膜の初期重量の半減時間の逆数で定義される分解速度 $V_{(1/2)}$ と初期 q 値との相関性を両対数プロットで表示したものである。図から明らかなようにPHPG膜とGIG(P)-11膜はそれぞれ固有の直線関係で与えられ、同程度の q 値で比較すると、後者は

Fig. 7 Rate of ficin digestion $V_{1/2}(\text{h}^{-1})$ of membranes at pH 7.4 and 37.0 °C in PECF as a function of swelling ratio (q): (1) PHPG-1, (2) GIG(P)-1, and (3) GIG(P)-4

前者より分解速度が大きくなる。これは、フィシン分解に対して側鎖部分の疎水性基効果をもつことを示している。一般に、疎水性基が酵素分解を促進させるという報告がすでに見られるが、その傾向に一致している[16]。

4. 結 論

PIをミドルブロック成分とし、その両側にポリ(N-ヒドロキシプロピル-L-グルタミン)を有するA-B-A型ブロックポリマー膜を調製した。この高膨潤度膜は架橋度を変えることにより、必要とする適当な膨潤膜の設計が可能となることが示された。

また、膜の膨潤度は架橋度に依存し、膜の性質に重要な役割を果たしている。また、PECF中での膨潤膜の力学的性質は膜の膨潤度と良好な相関性を示し、分子鎖中の親水性の程度に依存して典型的なエラストマー的挙動を示した。フィシンによる膨潤膜の酵素分解においても、分解速度は膜の膨潤度に強く依存していることが明らかにされた。さらに膜中の疎水性ブロック成分のミクロ不均一構造により、酵素分解過程において、相当するホモポリマー膜より耐久性が増していることが示唆された。

文 献

1. J. M. Anderson, K. L. Spilizewski, and A. Hiltner, in "Biocompatibility of Tissue Analogs" (Ed. D. F. Williams), CRC Press, N. W. Boca Raton, Florida pp.68-88 (1985).
2. T. Hayashi, M. Oka, and Y. Miyachi, in "Biomedical Functions and Biotechnology of Natural and Artificial Polymers" (Ed. M. Yalpani), ATL Press, pp.169-180 (1996).
3. Y. Miyachi, K. Jokei, M. Oka, and T. Hayashi, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, **7**, 805 (1996).
4. T. Hayashi, Y. Iizuka, M. Oya, and M. Iwatsuki, *J. Appl. Polym. Sci.*, **43**, 2223 (1991).
5. T. Hayashi, M. Iwatsuki, and M. Oya, *J. Appl. Polym. Sci.*, **39**, 1803 (1990).
6. R. Yoda, S. Komatsuzaki, E. Nakanishi, H. Kawaguchi, and T. Hayashi, *Biomaterials*, **15**, 944 (1994).
7. Y. Yoshida, K. Makino, T. Ito, Y. Yamakawa, and T. Hayashi, *Eur. Polym. J.*, **32**, 877 (1996).
8. GW. Chen, T. Hayashi, and A. Nakajima, *Polymer J.*, **13**, 433 (1981).
9. R. Yoda, S. Komatsuzaki, and T. Hayashi, *Biomaterials*, **16**, 1203 (1995).
10. GW. Chen, T. Hayashi, and A. Nakajima, *Polymer J.*, **16**, 805 (1984).
11. P. J. Flory, in "Principles of Polymer Chemistry", Cornell Univ. Press, Ithaca, New York and London, p.576 (1953).
12. E. Nakanishi, K. Hamada, E. Sugiyama, S. Hibi, and T. Hayashi, *Polymer J.*, **23**, 1053 (1991).
13. T. Hayashi, E. Nakanishi, and A. Nakajima, *Polymer J.*, **19**, 1025 (1987).
14. E. Nakanishi, E. Sugiyama, S. Hibi, H. Maeda, and T. Hayashi, *Polymer J.*, **23**, 983 (1991).
15. T. N. Salthouse, *J. Biomed. Mater. Res.*, **10**, 197 (1976).
16. T. Hayashi, K. Takeshima, and A. Nakajima, *Polymer J.*, **17**, 1273 (1985).