

学位論文

オリゴ糖ペンダントポリマーの合成とその機能評価
および応用に関する研究

2007年3月

熊本大学大学院自然科学研究科

佐藤 崇雄

目次

第1章 序論

1-1 オリゴ糖	2
1-2 オリゴ糖マクロモノマー	3
1-3 研究目的	5
1-4 研究方法	8
1-5 本研究の概要	9

第2章 オリゴ糖マクロモノマーの分子設計と合成・構造決定

2-1 はじめに	11
2-2 Glucose macromonomer の合成	14
2-3 Cellobiose macromonomer の合成	23
2-4 Cellotriose macromonomer の合成	31
2-5 Maltose macromonomer の合成	37
2-6 Maltotriose macromonomer の合成	44

第3章 オリゴ糖マクロマーの単独重合と物性評価

3-1 はじめに	51
3-2 種々のオリゴ糖マクロマー単独重合	53
3-3 分子量・分子量分布測定	60
3-4 動的光散乱法による分子サイズ測定	69
3-5 レクチンの糖鎖認識能による生理活性調査	74
3-6 示差走査熱量測定による高分子の保水性評価	81
3-7 透過型電子顕微鏡観察	84

第4章 両親媒性オリゴ糖ポリマーの合成と物性評価

4-1 はじめに	88
4-2 両親媒性オリゴ糖ポリマーの合成	91
4-3 蛍光プローブを利用した物性評価	103
4-4 透過型電子顕微鏡観察	109
4-5 動的光散乱法によるサイズ測定	110

4-6 SEC を利用した物性評価	112
第5章 オリゴ糖ポリマーの機能材料への応用	
5-1 はじめに	121
5-2 ポリマーとレクチンの特異的相互作用を利用した吸着剤の開発	124
5-3 酸素ガスバリアフィルムへの応用	141
第6章 総括	147
参考文献	149
謝辞	153

第一章 序論

1-1 オリゴ糖

糖鎖は細胞間の認識信号として、また生体内の活性発現の調節因子として重要な機能を担っている。細胞表面の糖鎖は集合体構造となることでレセプターたんぱく質に強く認識されることが多く、たんぱく質内の結合サイトのレベルから、細胞表層におけるたんぱく質の集合体のレベルまで含めて、『糖鎖クラスター効果』の重要性が生物学により指摘されている。これらの化学情報信号としての糖鎖の機能を活用して、生体認識機能をもつ物質を創成することが、化学サイドのみならず生物学サイドからも関心が寄せられている。天然の糖たんぱく質や糖脂質に含まれる糖鎖には複雑・精妙な構造をとっているものが多く、それらを酵素工学あるいは精密有機化学の手法により合成して活用しようとする試みも盛んに行なわれている¹⁾。しかし一方では、これらの複雑・精妙な糖鎖集合体をできるだけ単純化あるいはモデル化して、しかも天然複合糖鎖の精密な機能にどこまで迫れるか、あるいはそれを越えて天然にはない機能物質・機能材料の創製をめざした研究も行われている²⁾。例えばオリゴ糖マクロマーを化学的もしくは酵素的に合成する技術や、オリゴ糖を縮合して長い糖鎖を合成する技術、糖鎖に官能基を導入する糖鎖修飾技術がある。これらの開発は、糖鎖レベルにおける生体機能調節機能の解明と並ぶ糖鎖工学の重要な課題である³⁾。また高分子化学の分野では、ビニル系高分子、ポリペプチド、多糖などの側鎖に分子認識の機能素子として働く糖が結合している糖に注目が注がれ、オリゴ糖マクロマーの創製に関する研究が活発に行われている⁴⁾。さらに、このような糖鎖高分子は、低分子糖質にはみられない優れた機能を発現することも報告されている⁵⁾。そのため、各種物質との糖鎖ハイブリット材料の開発に糖鎖高分子は用いられてきた。また、生体内の複合糖質モデル化合物として糖鎖高分子は用いられ、さまざまな糖認識レセプターとの相互作用の研究が行われている⁶⁾。

1-2 オリゴ糖マクロモノマー

糖鎖ビニルモノマーのラジカル重合は、その簡便さゆえ、糖鎖高分子を合成するためのルートとして発展を遂げ、多種多様な系が確立されている。例えばアクリレートおよびメタクリレート型の糖担持モノマーの合成方法として、モリブデンのオキソ酸の脱水縮合により生成する酸化物クラスターから成るヘテロポリ酸をグリコシル化反応の触媒として、glucoseと2-hydroxyethylacrylateを結合させる方法がある⁷⁾。 α と β 型アノマーの混合物が生成するが、保護基を使わず合成できることから、工業用糖鎖

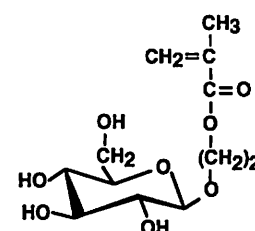


Figure 1-1 Chemical structure of GEMA

高分子のモノマーとして用途の拡大が図られている (Figure 1-1)。

また糖担持マクロモノマーの合成方法として、糖の有す還元末端を利用する方法が報告されている。例えば、lactoseの還元末端を次亜ヨウ素酸で酸化した後、

中和シラクトースラクトンとする。次にメタノール中で *p*-vinylbenzylamine と加熱還流し、スチレン誘導体を得る。

Figure 1-2に示す方法では、還元末端を持つ他のオリゴ糖に拡張することが可能であり、長さの異なる各種オリゴ糖を結合したスチレン誘導体が調製されている⁸⁾。また、

glucosamineを用いた合成系では、*N*-acetyl glucosamineのオキサゾリン誘導体と4-penten-1-olとのグリコシル化により糖担持ビニル化合物 (Figure 1-3) が合成されている¹¹⁾。この方法は、還元末端に*N*-acetyl glucosamineをもつ他のオリゴ糖においても可能な手法である⁹⁾。例えば、高い生理活性を示す糖鎖高分子の調製を目的として、三糖を有するモノマーが合成されている。また、アグリコン（非糖質部分）の長さの異なるモノマーが合成されており、それらの研究から糖質から二重結合までの距離が重合挙動に大きな影響を及ぼすことが明らかにされた¹⁰⁾。セルロースの還元性末端基には他の水酸基とは違う反応性を示すヘミアセタール性水酸基が存在しこの水酸基を利用すると、セルロースの還元性末端基のみに特異的に官能基が導入することが可能であり、このような研究が行われている¹¹⁻¹⁴⁾。例えば、Scheme 1-1に示すように上高原らはAmino基をβ-Glycoside結合で導入したセルロース誘導体を新規に合成し、種々の疎水性官能基との反応による両親媒性セルロース誘導体を合成している。まず、疎水性官能基を導入するための化合物として15-hydroxypentadecanoic acid (1) から多段反応経路で15-azidopentadecanoic acid (2) と15-thiol-pentadecanoic acid (3)を新規に合成した。

2, 3, 4, 6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosylamine (4)とpentadecanoic-β-D-Cellobiosylamine (5)をモデル化合物として、(1)との縮合反応を行い、化合物(6)と(7)がそれぞれ合成される。同様に、(5)と(2)から(8)が合成された。そこで、β-peracetylcelluloseから、アジド化とそれに続く接触還元によりアミノ基が還元性末端に導入されたセルロース誘導体(9) ($n = 15$) を合成し(1), (2), (3)との縮合反応を行ったところ、化合物(10), (11), (12)がそれぞれ得られた。よって、セルロースの還元性末端アミノ基を利用した疎水性官能基の導入が可能であることが判明したと報告している。

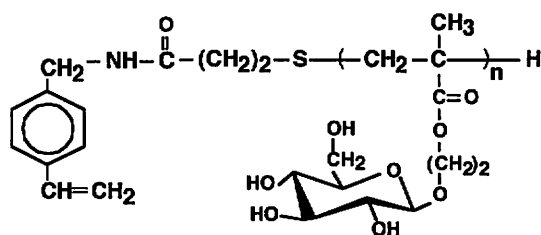


Figure 1-2 Chemical structure of oligosaccharide macromer

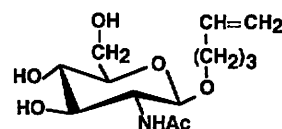


Figure 1-3 Chemical structure of *N*-acetyl glucosamine compound

このようにして合成されたオリゴ糖モノマーは、通常のラジカル重合では、生成されるポリマーの分子量、分子量分布の精密な制御はできない。それらの制御されたオリゴ糖マクロマーを合成することは更なる高い機能を付与させる有効な手段である。このようなオリゴ糖マクロマーの精密合成は、イオン重合¹⁵⁾や開環重合¹⁶⁻¹⁷⁾といった比較的煩雑な手法によって行われてきた。しかし最近、リビングラジカル重合法を糖鎖ビニルモノマーに応用して、精密重合を簡便に行う合成系が報告されている。その一例として、Scheme 1-2 に示す安定ニトロキシルラジカルを用いた系がある¹⁸⁾。安定ニトロキシルラジカルを用いた重合系では、通常ニトロキシルラジカルとして 2,2,6,6-tetramethylpiperidiloxy (TEMPO) が使われる。その場合、良好な構造制御を達成するための条件として、ポリマーとニトロキシル間の結合 (C-ON 結合) の熱解離速度が十分大きいことが要求され、120 °C 付近で重合を行わなければならない。ところが、TEMPO を用いたスチレン誘導体 (VLA) の 120 °C の重合では反応溶液が変色し、重合は規制されない。これは温度が高すぎて、糖残基が分解するものと考えられた。そこで、重合を開始させる低分子アルコキシアミンとして styrene / di-tert-butyl nitroxide (DBN) 付加体 (St-DBN) を使い、DMF 中 105 °C で重合が行われた。反応時間に伴い、VLA の重合率は増加し、数平均分子量は、VLA の重合率に対して直線的に増加し理論値とほぼ一致したと報告されている¹⁹⁾。また、Scheme 1-3 に示す原子移動ラジカル重合もリビング的に反応が進行すると報告されている²⁰⁻²¹⁾。原子移動ラジカル重合の場合、ポリマー主鎖の長さが規制された分散の小さい構造の明確なポリマーが生成する。従ってセロピオース誘導体 (1) の重合反応は生成物が反応溶媒中で沈殿することもなく均一に進行する。所定の反応時間後、反応混合物中のモノマー (1) は TLC 上でほぼ消失していたことから、重合は定量的に進行したことが確認された。GPC 分析により、poly (1) は数平均分子量 1.2×10^4 (ポリスチレン換算) であり、またその分子量分布については分散多度が 1.07 と非常に狭く、単分散に近い新規ポリマーであるといえる²²⁾。

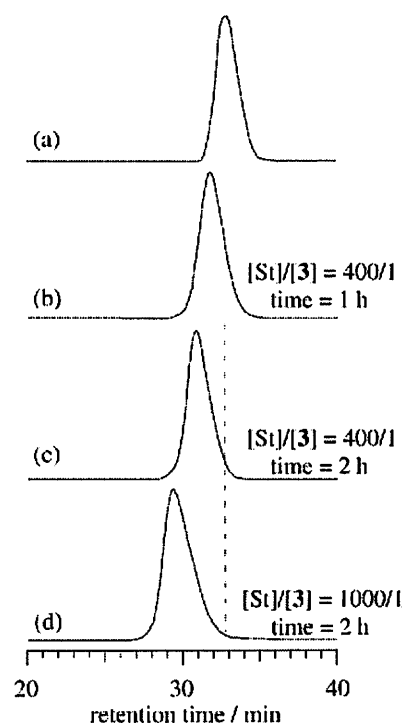
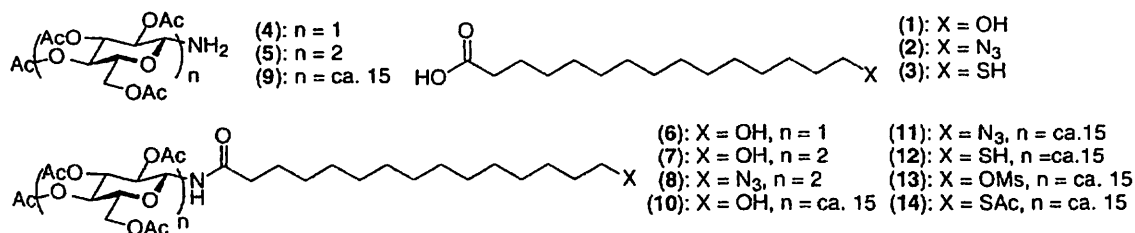
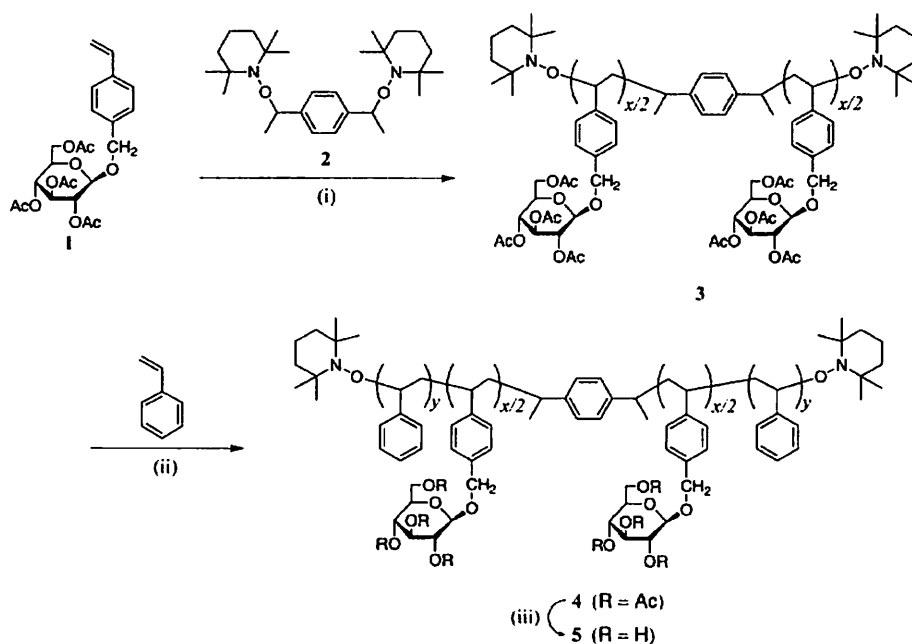


Figure 1-4 SEC chromatograms of (a) glycoconjugated prepolymer and (b) ~ (d) the product obtained from the polymerization of St

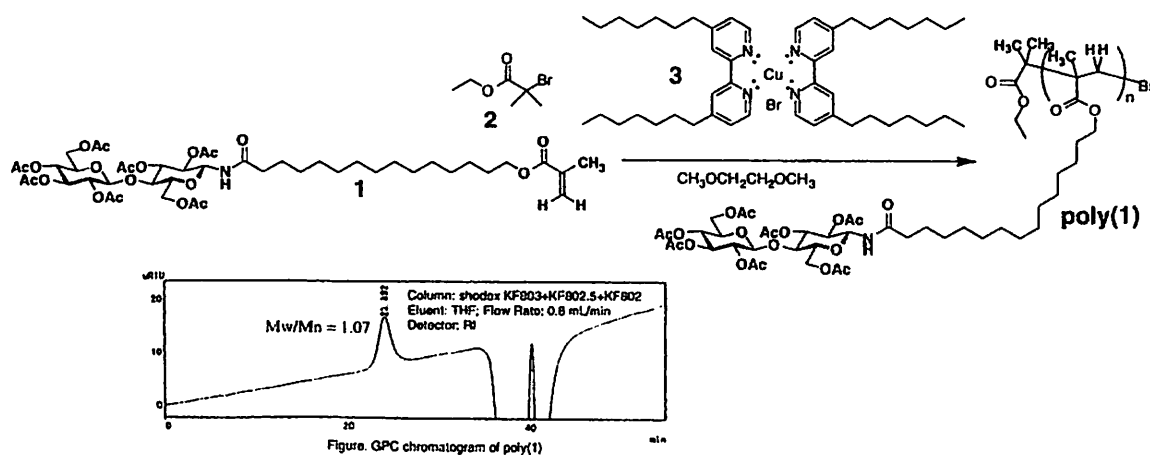


Scheme 1-1 Synthesis scheme of cello-oligosaccharide macromer



Conditions: (i) chlorobenzene, CSA, 125 °C; (ii) chlorobenzene, 125 °C; (iii) NaOMe-MeOH, THF

Scheme 1-2 Synthesis of glycoconjugated triblock polymer



Scheme 1-3 Typical process of atom transfer radical polymerization

1-3 研究目的

近年、地球規模の環境問題がますます深刻化している。現在、全世界で年間約 1.5 億トンもの合成高分子が石油から合成され、そのほとんどが大量廃棄されている背景の下、材料開発において、高性能化に加え、環境への負荷を最小にする、天然資源を最大限に利用したゼロエミッションを目指した材料開発の必要性が高まってきた。その背景のもと、我々は天然に豊富に存在する高分子として知られるセルロースを有用な形態へ変換することによりこの目標の達成を試みた。具体的には、セルロースをビスコース相分離法により微粒子化し¹⁵⁾、その界面を化学修飾することによりさまざまな分野での応用に成功してきた¹⁵⁾。しかし、セルロースは分子内・分子間に非常に強い水素結合を有するため溶媒への親和性が乏しく、前述のセルロース微粒子のサイズは Fig. 1-5 の粒度分布図が示すように、5 μm 以下に制御するのは非常に困難である。この有用なセルロース微粒子がナノレベルでサイズ制御することができれば、その適用分野は飛躍的に増大すると考えられる。そこで本研究では、セルロースを構成単位のオリゴ糖に分解し、有機合成的手法をもちいて再度高分子化することによって、溶媒への親和性を高め、ナノサイズのオリゴ糖粒子の創製を試みた。

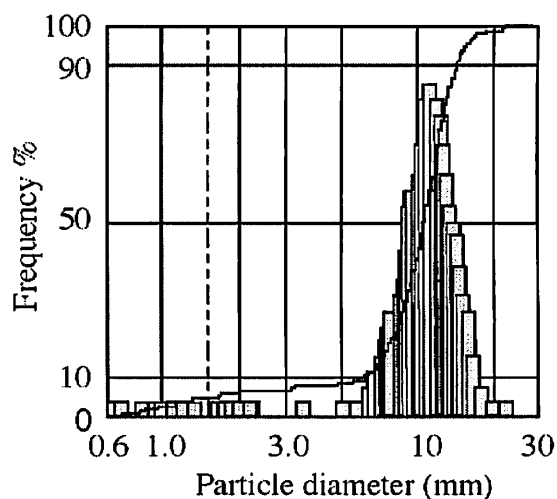
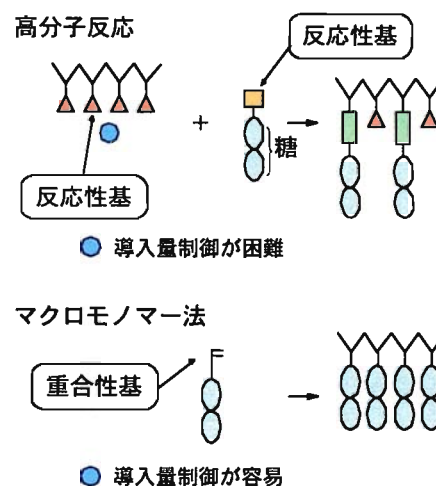


Figure 1-5 Particle size distributions of cellulose micro particles measured by the FPIA-2100 with the flat-sheath flowmethod.

1-4 研究方法

セルロースの構成単位である種々のオリゴ糖に、重合成官能基を導入し高分子化することにより、側鎖に糖を有するポリマー（側鎖型糖鎖高分子）の合成を検討した。側鎖型糖鎖高分子は、高度な機能を有する新しい高分子材料としての応用が期待される。側鎖型糖鎖高分子は、主鎖中に糖を有する主鎖型糖鎖高分子と異なり、性質や物性は主に主鎖の構造に依存し側鎖の糖は、その機能を受け持つ。これは、糖自体が高分子化合物としての性質に大きく関与する多糖等の主鎖型糖鎖高分子と大きく異なる点である。そのため側鎖型糖鎖高分子の糖の構造については、より幅広く自在な設計が可能であり、糖のもつ高度な機能を最大限引き出すことが可能となる。側鎖型糖鎖高分子の合成には大きくわけてふたつの方法が考えられる。ひとつは主鎖となる高

分子に、側鎖を化学反応により結合させる高分子反応である。しかしこの方法においては、主鎖高分子や糖末端に反応性官能基を導入しなければならないことや、側鎖の導入量が制御できないなどの問題がある。もうひとつの方法は、側鎖となる化合物に重合性官能基をあらかじめ導入し（マクロモノマー化）、これを重合することで主鎖を構築する方法である。この方法は側鎖の導入量が容易に調節できるなど、高分子反応に比べて利点も多い。今回は後者の方法でセロオリゴ糖マクロマーの合成を行い、そのポリマーの形態観察及び機能評価を行うことを目的とした。Fig. 1-7 に研究デザインを示した。



1-5 本研究の概要

本論文は6章から成っており、第1章を序論、第6章を総括とした。

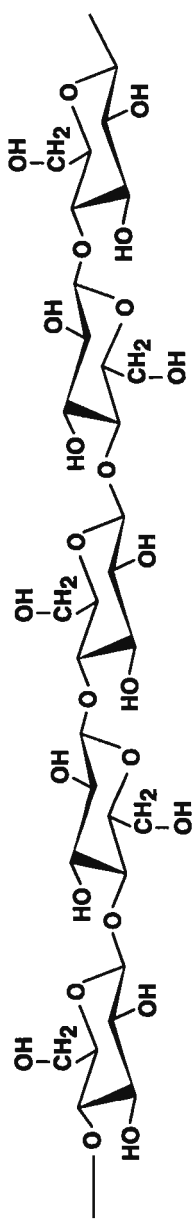
第2章では、種々のオリゴ糖に保護基を用いない簡便な合成スキームで、重合性官能基を導入について検討した。その結果、オリゴ糖の水酸基のうち還元性を示す第一位の水酸基のみをアミノ基に変換したのち、水酸基とアミノ基の反応性の違いを利用して、多数の水酸基を保護することなく、アミノ基のみに重合性官能基を導入することが可能であることが明らかになった。

第3章では、得られたオリゴ糖マクロモノマーを水系重合反応によりポリマー化し、その分子量・分子量分布、光散乱及び透過電子顕微鏡等を用いて溶液物性についても検討した。その結果、重合により得られたオリゴ糖側鎖型ポリマーは、水中においてプルラン換算で数千万の分子量に相当する巨大な会合体として存在することがサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) の測定結果より明らかになった。さらに光散乱及び透過電子顕微鏡観察より、会合体は20~30 nmの真球状であることが確認された。加えて¹³C-NMRを利用して高分子主鎖の立体構造についての調査も行った。

第4章では、新たに調製した両親媒性オリゴ糖高分子を利用し、高分子ミセル型のナノ粒子の創製について検討を行った。高分子主鎖の片末端のみに疎水部を導入した両親媒性化合物と、高分子側鎖に疎水部を導入した両親媒性化合物を合成し、臨界ミセル濃度や、会合形態などを調査した。その結果、高分子主鎖の片末端のみに疎水部を導入した両親媒性化合物においては、規則的な疎水空間をもつミセルを形成することが明らかになった。

第5章では、得られたポリマーの酸素ガスバリアフィルムへの応用を検討した。その結果、現存する親水性高分子から調製されたフィルムと比較して優れたバリア性をもつことが示され、さらに高湿度状態においても高いバリア性を保持することも明らかになった。加えて、シリカゲル等にポリマーをグラフト化することによってレクチン吸着剤などへの応用を検討し、特定のレクチンのみを吸着することが確認され、レクチン吸着剤として有用であることを確認した。

第6章ではこれらの結果をまとめるとともに、貢献できる分野・将来の展望について論じた。

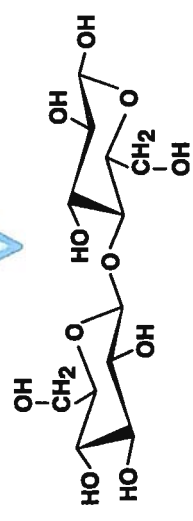


cellulose

Cellulose is the most abundant, renewable organic raw materials.
 Strong hydrogen bonding and high crystallinity

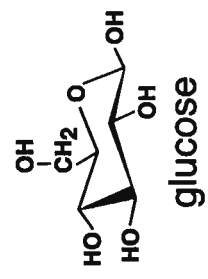


Decomposition



cellobiose

Introduction of vinyl group



glucose

Homo polymerization
 Co polymerization
 Telomerization



cello-oligosaccharide polymer

Strength, processability

● Depending on the **main chain**

Function

● Depending on the **side chain**

Application

● Biocompatible materials

● Oxygen-barrier film

● Chiral stationary phase for HPLC

Figure 1-7 Summary of synthesis and characterization of cello-oligosaccharide macromer

第二章

オリゴ糖マクロモノマーの分子設計と合成・構造決定

2-1 はじめに

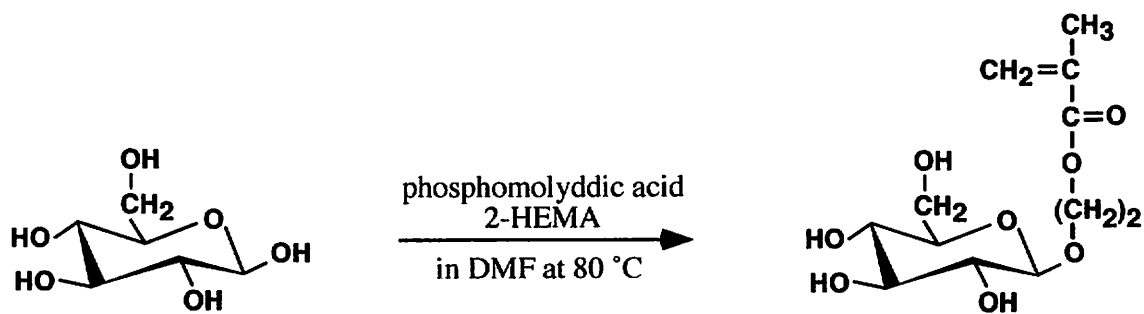
糖を側鎖に有するビニルモノマー（糖側鎖型ビニルモノマー）の開発は、近年活発な研究が行われている。例えば、K. Kobayashi らは lactose 担持スチレンモノマーを合成し、ラジカル重合により得られたポリマーの強いインフルエンザウイルス捕捉機能の発現を見いだした³¹⁾。また、M. Akashi らは Scheme 2-1 に示すように glucose の 1 位の水酸基に触媒を用いて、重合性官能基を導入した glucosyloxyethylmethacrylate (GEMA) の合成を報告している³²⁾。GEMA は抗血栓材料や免疫分液システムへの応用が検討されている³³⁾。しかしながら選択的な重合性官能基の導入が困難であり、多官能の誘導体が生成することが Figure 2-1 に示す HPLC 分析により確認された。一方 H. Kamitakahara らは、選択的な重合性官能基の導入を行うために Scheme 2-2 に示すように糖の水酸基を保護基を用いて保護し、その後多段階プロセスを経て重合性官能基を導入している³⁴⁾。

本研究では、保護基を用いず短い反応経路で、糖の水酸基に選択的に重合性官能基の導入を目的とした。glucose, cellobiose, cellotriose などの oligosaccharide は還元性水酸基をアノマー位に 1 個有す。この還元性水酸基は、他の水酸基とは異なる反応性をもつため、炭酸水素アンモニウムを用いることにより、アミノ基に容易に変換することができる³⁵⁾。そこで、アミノ基と水酸基の反応性の違いを利用して、選択的にアノマー位へ重合性基を導入し、Scheme 2-3 に示す経路で一官能性のオリゴ糖ビニルモノマーの合成を検討した。合成は、FT-IR, ¹H-NMR, HPLC, 元素分析により確認した。

本章で用いた主な試薬及び溶媒を Table 2-1 に示す。また、構造決定に用いた分析機器を以下に示す。

Table 2-1 本章で用いた主な試薬及び溶媒

試薬名	会社名	カタログNo.
アセトニトリル	和光純薬工業 (株)	015-08633
重水	関東化学 (株)	13366-4M
D-(+)-グルコース	和光純薬工業 (株)	041-00595
D-(+)-セロビオース	東京化成 (株)	C 0056
セロトリオース	生化学工業	400400
ラクトースー水和物	和光純薬工業 (株)	129-00092
マルトースー水和物	和光純薬工業 (株)	138-00611
マルトトリオース	生化学工業	400530
炭酸水素アンモニウム	和光純薬工業 (株)	017-02875
2-isocyanatoethylmethacrylate	昭和電工 (株)	



Scheme 2-1 Synthesis scheme of glucosyloxyethylmethacrylate



Scheme 2-2 Synthesis scheme of cellobiose derivative using protect groups

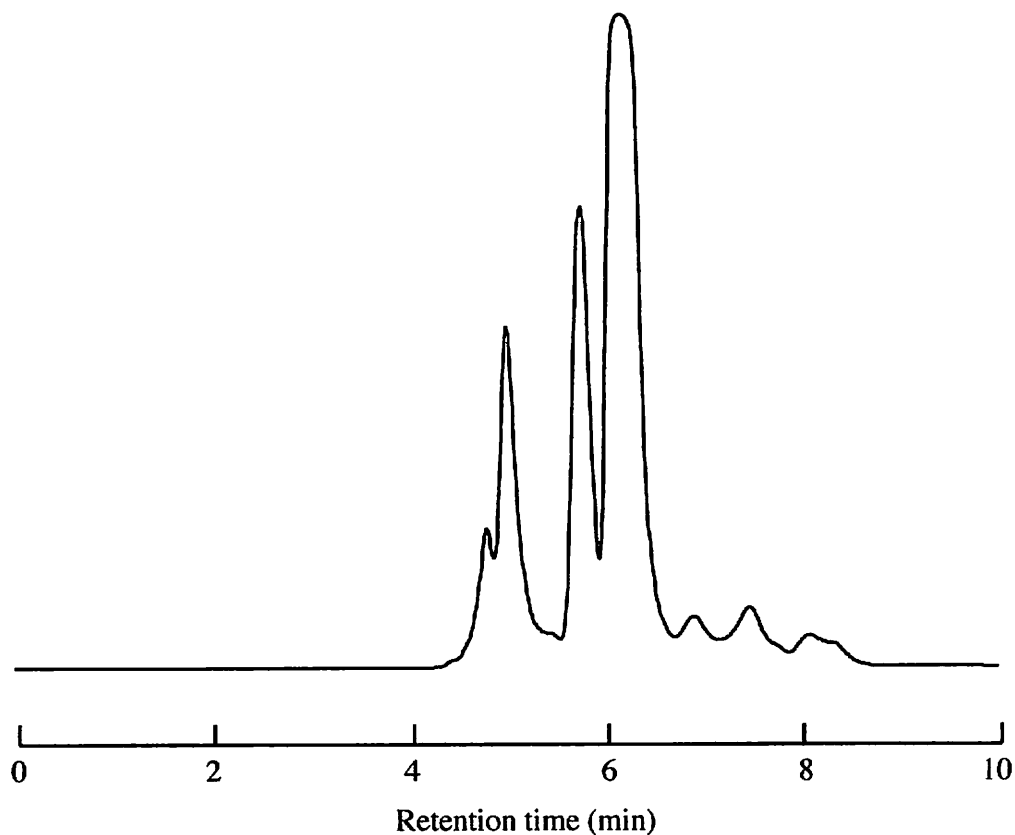
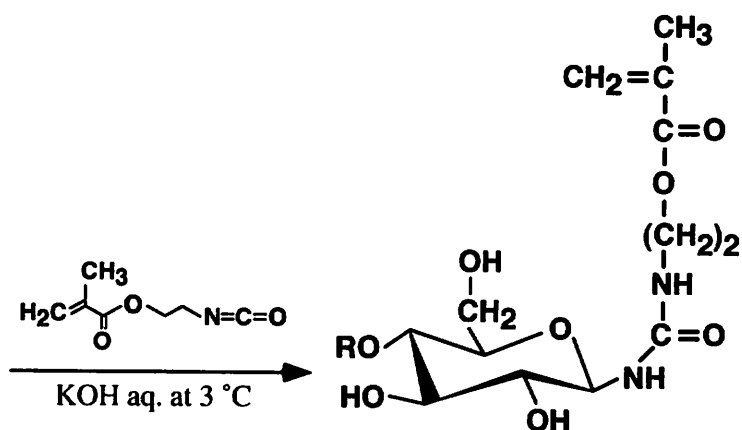
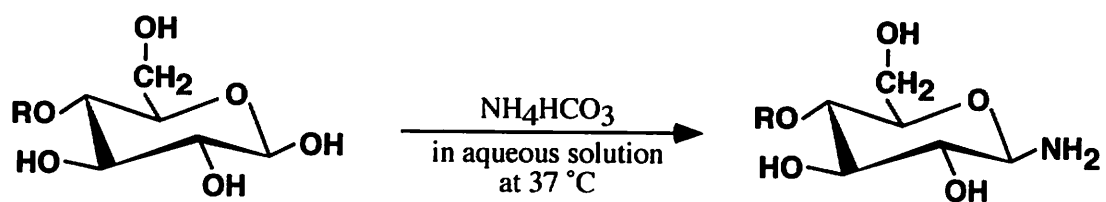
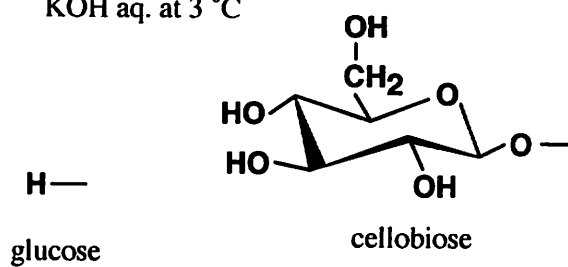


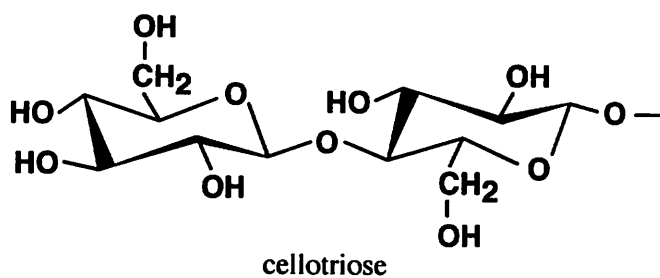
Figure 2-1 Chromatogram of glucosyloxyethylmethacrylate with Asahipak NH2P-50 (4.6 mm I.D. x 250 mm) at 20 °C. Mobile phase: Acetonitrile -water (7 : 3), flow rate: 0.5 ml/min, UV detection wavelength: 210 nm.



KOH aq. at 3°C



R =



Scheme 2-3 Synthesis process of monovinyl saccharide

【FT-IR】

JASCO FT/IR-700 Fourier Transform Infrared Spectrometer

【HPLC】

JASCO PU-1580 Intelligent HPLC Pump

JASCO DG-1580-54 Quaternary Gradient Unit

JASCO LG-1580-04 4-Line Degasser

JASCO CO-1560 Intelligent Column Thermostat

JASCO MD-1510 Multi Wavelength Detector

JASCO RI-1530 Intelligent RI Detector

【¹H-NMR】

JEOL JNM-EX400 FT-NMR SYSTEM

2-2 Glucose macromonomer の合成

2-2-1 glucosylamine の合成

glucose 10 g (55.56 mmol)を 300 ml ビーカー中, 水 150 ml に溶かし, 炭酸水素アンモニウムを 28.5g ずつ 24 時間毎, 4 回加え(全量 113 g), 開放したまま, 37 °C で 96 時間かきまぜた。その後, 蒸留水 200 ml を加え, 20 ml まで水を留去した後, 150 ml の水を加え, 10 ml まで濃縮した。この操作をアンモニア臭が消失するまで繰り返し, 凍結乾燥後, 白色固体を得た。元素分析値を Table 2-2 に示す。

Table 2-2 Elemental analysis of glucosylamine

	H (%)	C (%)	N (%)	C/N
Calcd.	7.31	40.2	7.81	5.15
Found	6.85	40.0	2.50	16.0

得られた白色固体と合成原料である glucose の赤外吸収スペクトルを Figure 2-2 に示す。得られた白色固体の赤外吸収スペクトルより原料の glucose には見られない, 1650 cm⁻¹ 付近に, N-H 変角振動に由来するピークが出現し, glucose へのアミノ基の導入が確認された。合成原料である glucose, 得られた白色固体の HPLC 分析を行った。クロマトグラムを Figure 2-3 に示す。それぞれのピークの面積比より純度を算出したところ, 純度は 83.7 % であった。

合成原料であるglucose, 得られた合成化合物のglucosylamineのプロトン核磁気共鳴スペクトルをFigure 2-4, Figure 2-5に示す。glucoseは水溶液中で α 型, β 型, 開環型の3種類の構造をとることができる。また, glucoseの環状構造の立体配座の一つである, ヘミアセタール環の酸素の結合角 ($DC-O-C = 111^\circ$) はシクロヘキサン環の炭素の結合角 ($DC-C-C = 109^\circ$) とほとんど等しく, 糖のピラノース環はシクロヘキサン環と同様, 同一平面には存在しない。6員環はイス形かボート形の立体配座をとりうるが, グルコピラノースの場合, イス形の立体配座をとれば最もひずみが少なく, 大きい官能基 ($-OH$, $-CH_2OH$) が6員環の面から横に突き出して安定である。この結合を水平方向の結合と呼ぶ。Figure 2-6にD-(+)-glucoseの立体配座を示す。

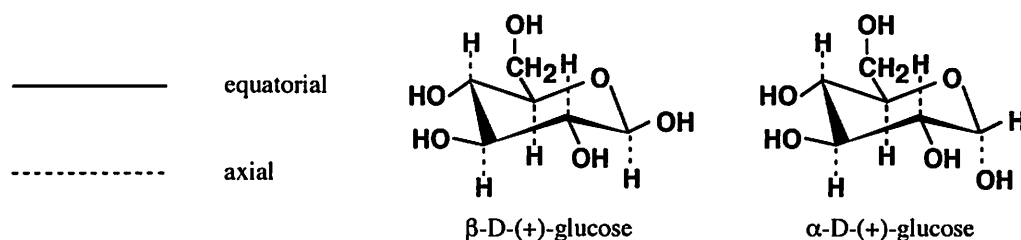


Figure 2-6 Conformation images of α and β -(D)-glucopyranose

β 型では $-OH$ と $-CH_2OH$ は水平方向, $-H$ は軸方向に結合している。この形は, $-OH$ と $-CH_2OH$ が軸方向に結合するよりも安定である。 α 型の立体配座も同様であるが, 1位の水酸基だけ軸方向の結合になる。このため水溶液中では, 大きい官能基 ($-OH$, $-CH_2OH$) がすべて水平方向に出ている β 型のほうが安定である。実際, glucoseを水に溶解させ変旋光が平衡に達したとき, α 型が36%, β 型が63%, 開環型が1%であることが確認されている³⁷⁾。Figure 2-4のglucoseの 1H -NMRスペクトルにおいて, 4.6 ppm付近に β 型構造に由来するピーク, 5.2 ppm付近に α 型構造に由来するピークが確認された。これらのピークのプロトン比より, α 型が36%, β 型が64% であると考えられる。Figure 2-5のglucosylamineの 1H -NMRスペクトルにおいては, 4.2 ppm付近に β 型構造に由来するピーク, 4.9 ppm付近に α 型構造に由来するピークが確認された。1位の炭素原子にアミノ基が結合したことにより, 高磁場側にシフトしたと考えられる。また5.2 ppm付近にglucoseの α 型構造に由来すると推測されるピークが確認された。これらの 1H -NMRスペクトルの結果より, glucosylamineは合成されたと確認した。

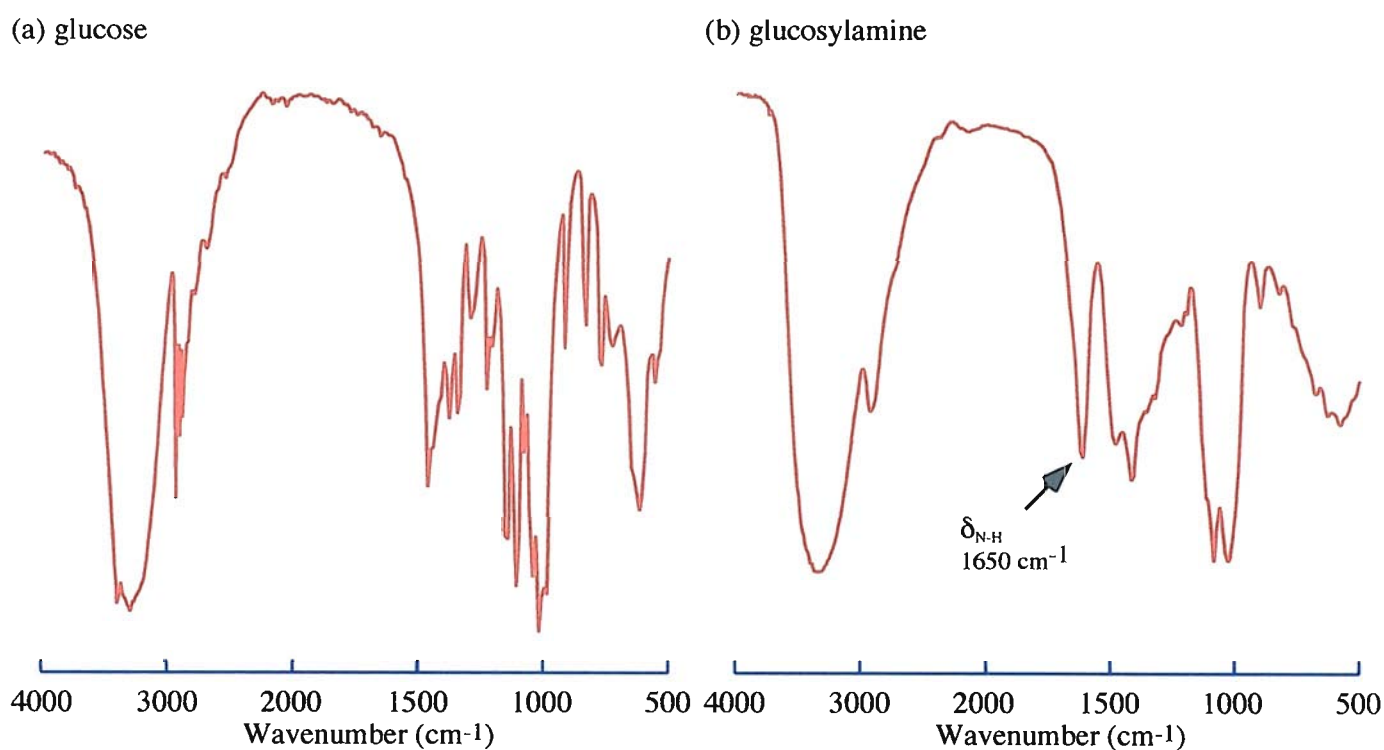


Figure 2-2 FT-IR spectra of (a) glucose and (b) obtained glucosylamine

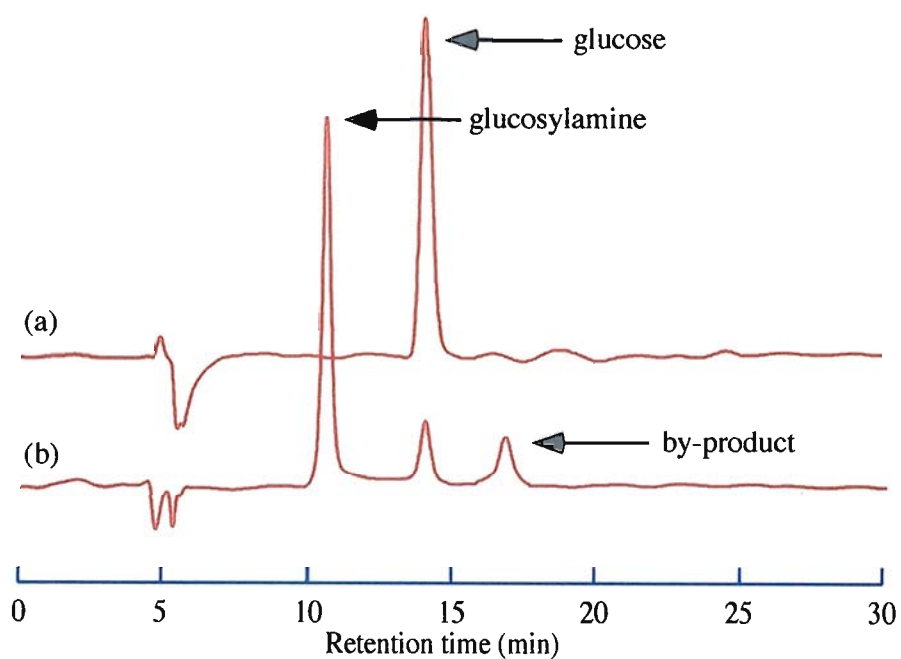
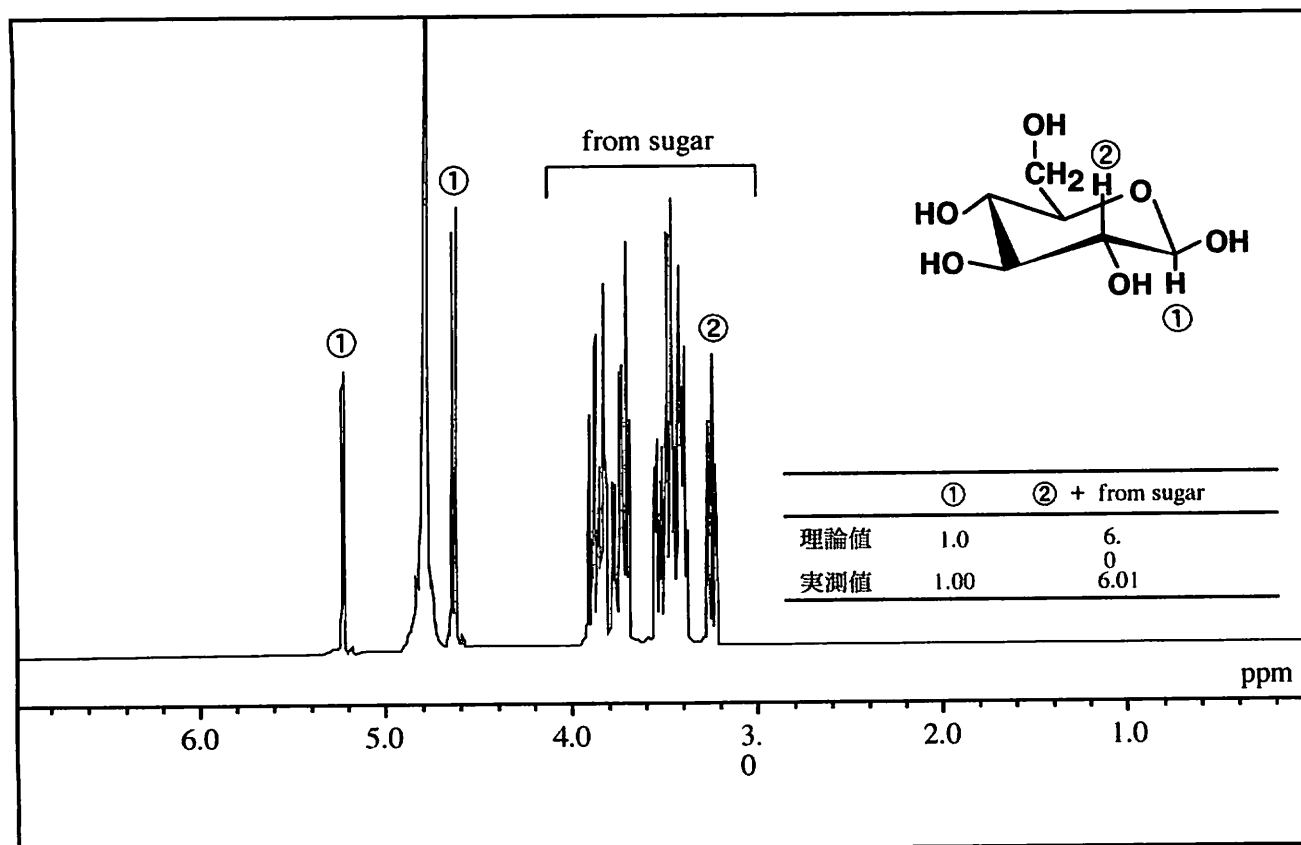
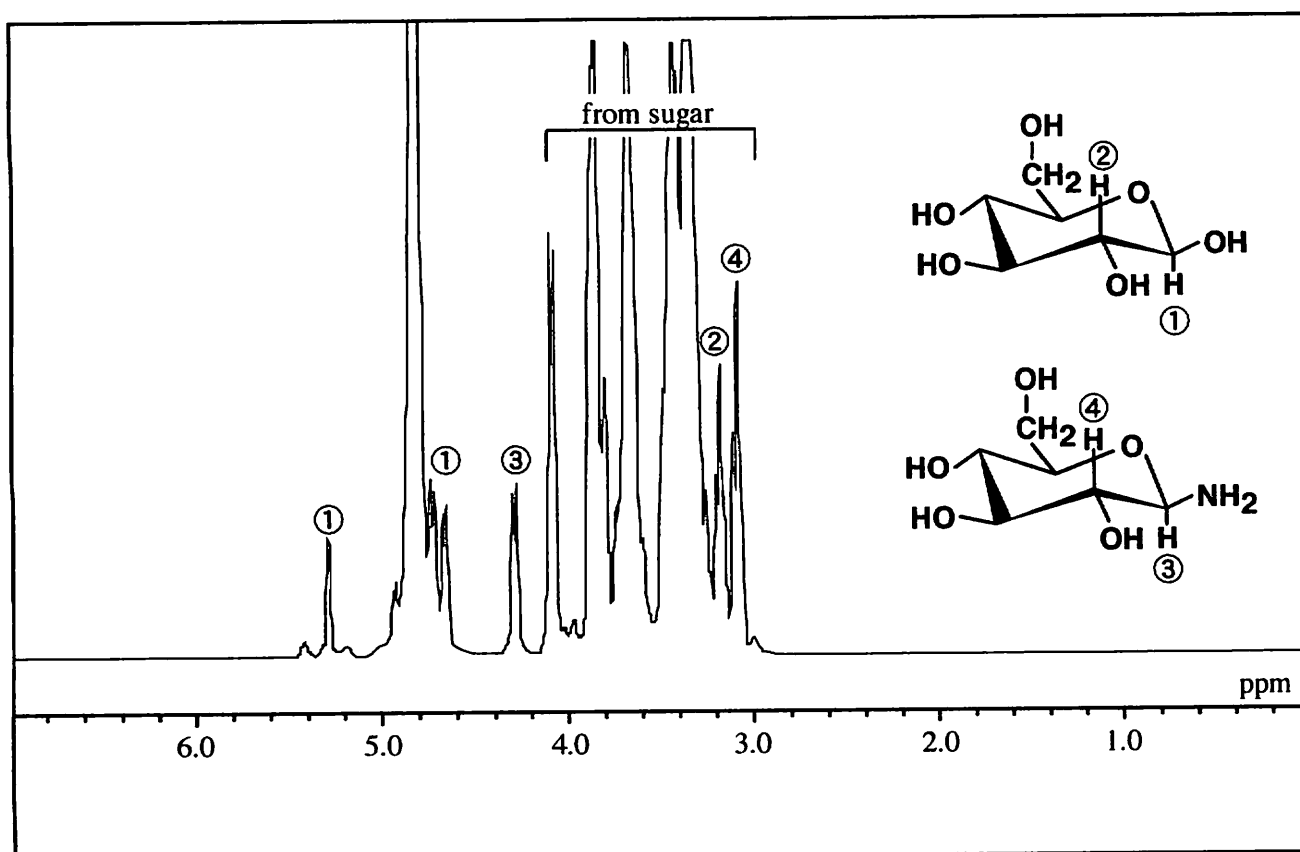


Figure 2-3 Chromatograms of (a) glucose and (b) obtained glucosylamine with Asahipak NH2P-50 (4.6 mm I.D. x 250 mm) at 20 °C. Mobile phase: Acetonitrile -water (7 : 3), flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.

Figure 2-4 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of D-(+)-glucoseFigure 2-5 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of obtained glucosylamine

2-2-2 2-(methacryloyloxy)ethylureido glucose の合成

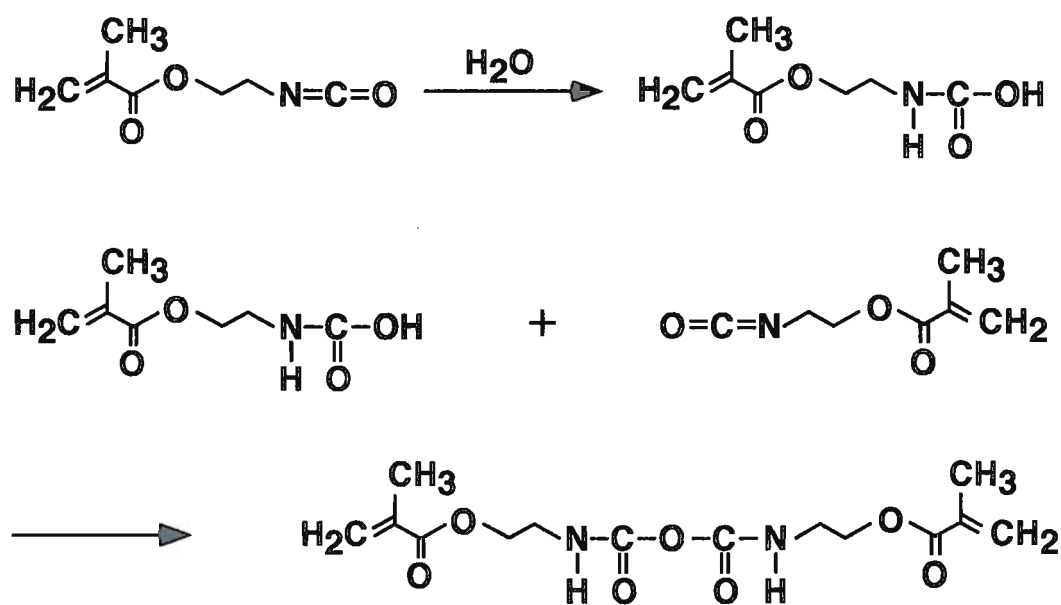
先に合成した glucosylamine 5.74 g (純度 83.7 %, 26.8 mmol) を 1×10^{-3} M KOH 水溶液 50 ml に溶解させた。その水溶液に、2-isocyanateethyl methacrylate (2-IEM) を 10.4 g (67.0 mmol) を加えて、3 °C に保ったまま 12 時間、激しくかき混ぜた。12 時間後、フラスコ内に白色固体が析出していたため、これをろ過し固液分離した。固相はそのまま凍結乾燥し白色物 (a) を得た。液相は、未反応の 2-IEM を除去するため、20 ml のジエチルエーテルを用いて 4 回洗浄し凍結乾燥を行った。凍結乾燥終了後、得られた白色固体を水 2 ml, メタノール 10 ml の、混合溶液に溶解させ、ジエチルエーテル 80 ml とアセトン 20 ml の混合溶液に滴下し冷却した。その後、G3 ガラスフィルターでろ過し減圧乾燥し白色物 (b) を得た。

合成原料である glucosylamine, 2-IEM, 得られた白色物 (a), 白色物 (b) の FT-IR スペクトルを Figure 2-7, Figure 2-8 にそれぞれ示す。白色物 (a) のスペクトルでは、 1590 cm^{-1} に NH-CO-NH 相互伸縮、 1620 cm^{-1} に C=O (urea) 伸縮振動、 1720 cm^{-1} に C=O (ester) 伸縮振動、さらに 3380 cm^{-1} には N-H 伸縮振動に由来するピークがそれぞれ確認された。このスペクトルからは、 $3000\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ 付近に出現する、糖の OH 伸縮振動に由来するピークは確認されず、白色物 (a) は糖を含有していないと推測される。Scheme 2-4 に示すように 2-IEM は水と反応してジビニルウレアを生成する。白色物 (a) の元素分析値を Table 2-3 に示す。従って、白色物 (a) は Scheme 2-4 の経路で生成した副生成物であると確認された。白色物 (b) のスペクトルでは、 1570 cm^{-1} に NH-CO-NH 相互伸縮、 1650 cm^{-1} に C=O (urea) 伸縮振動、 1710 cm^{-1} に C=O (ester) 伸縮振動、さらに $3000\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ 付近には糖の OH 伸縮振動に由来するピークがそれぞれ確認された。このスペクトルより白色物 (b) は、目的生成物である 2-(methacryloyloxy)ethylureido glucose はであると確認された。白色物 (b) の元素分析値を Table 2-4 に示す。

Table 2-3 Elemental analysis of by-product

	H (%)	C (%)	N (%)	C/N
Calcd.	7.09	54.9	9.85	5.57
Found	7.02	54.9	9.85	5.57

合成原料である glucosylamine, 得られた白色物(監)の HPLC 分析を行った。クロマトグラムを Figure 2-3, Figure 2-9 に示す。Figure 2-3 に示すように glucosylamine のピークが消失し, 新たに紫外可視領域に吸収を有する化合物の出現が認められた。これは目的生成物である 2-(methacryloyloxy)ethylureido glucose のビニル基に由来する吸収と考えられる。それぞれのピークの面積比より純度を算出したところ, 純度は 66.5 % であった。白色物 (b) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを Figure 2-10 に示す。1.9 ppm にメチル基 ($-\text{CH}_3$), 4.2 ppm 付近にはメチレン基 ($-\text{CH}_2-$), 5.7 ppm と 6.1 ppm にはビニル基 ($\text{C}=\text{CH}_2$) に由来するピークが確認され, 3.3~4.0 ppm 付近には糖骨格に由来するピークが確認された。



Scheme 2-4 Synthesis of divinylurea as by product

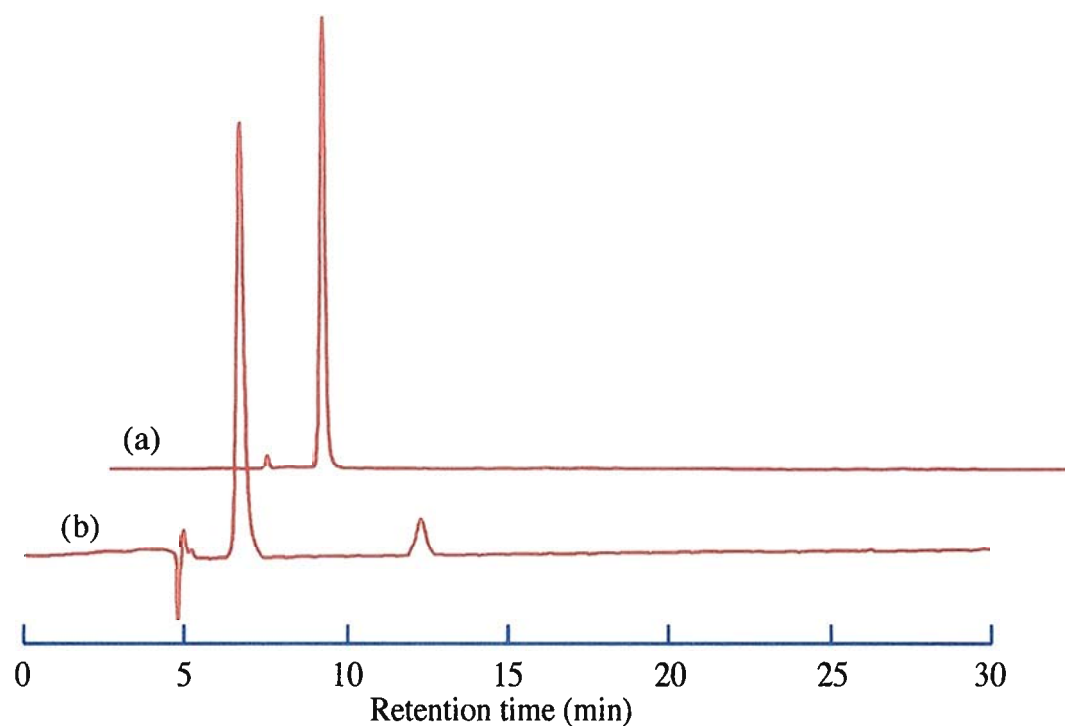
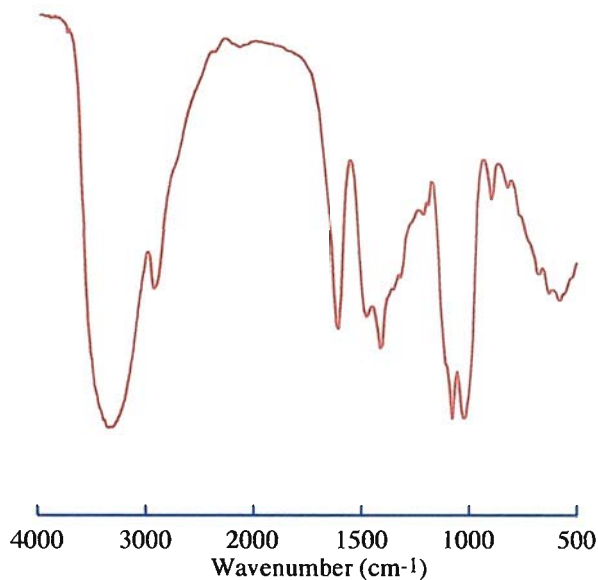
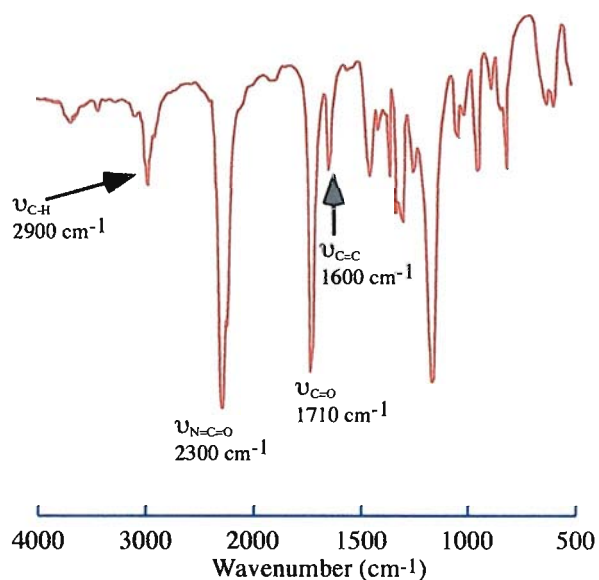


Figure 2-9 Chromatograms of obtained 2-(methacryloyloxy)ethylureido glucose with Asahipak NH2P-50 (4.6 mm I.D. x 250 mm) at 20 °C. Mobile phase: Acetonitrile -water (7 : 3), flow rate: 0.5 ml/min, (a) UV detection wavelength: 210 nm, (b) RI detection.

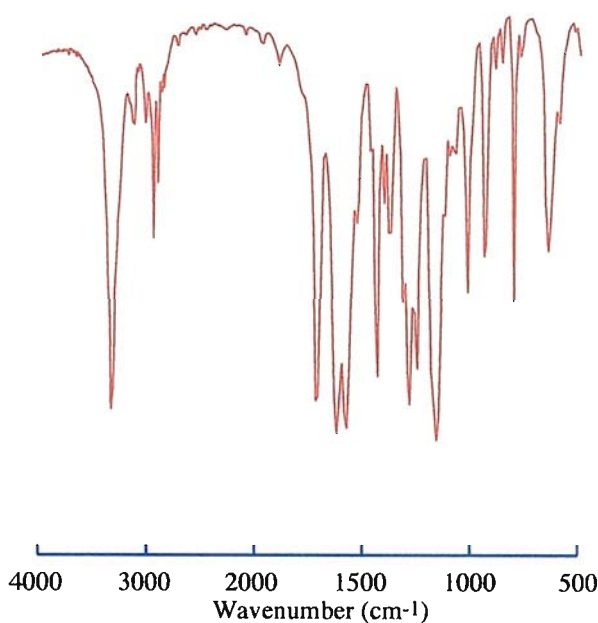
(a) glucosylamine



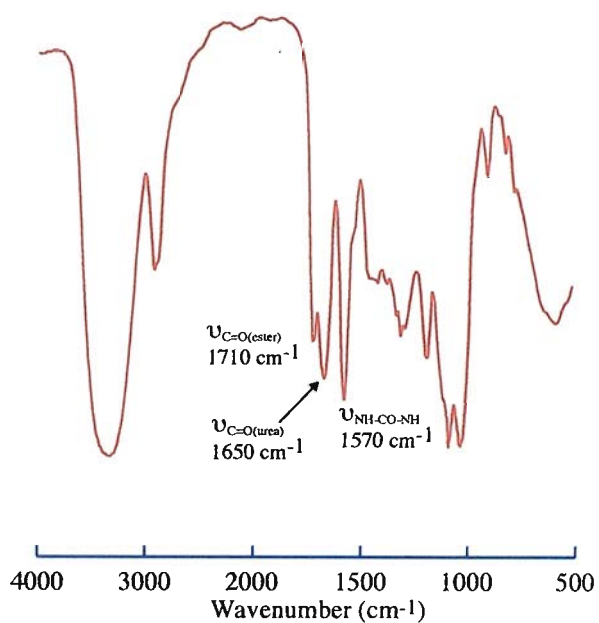
(b) 2-isocyanateethyl methacrylate

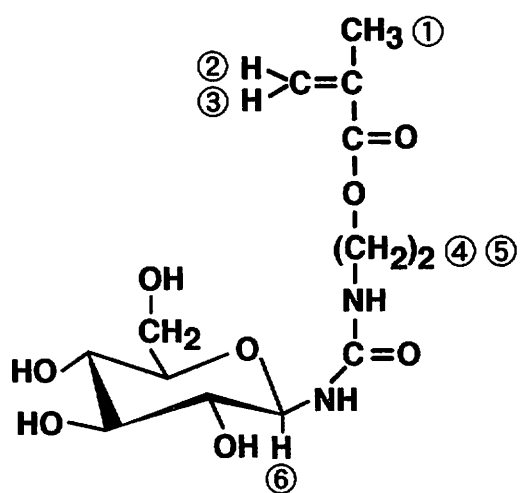
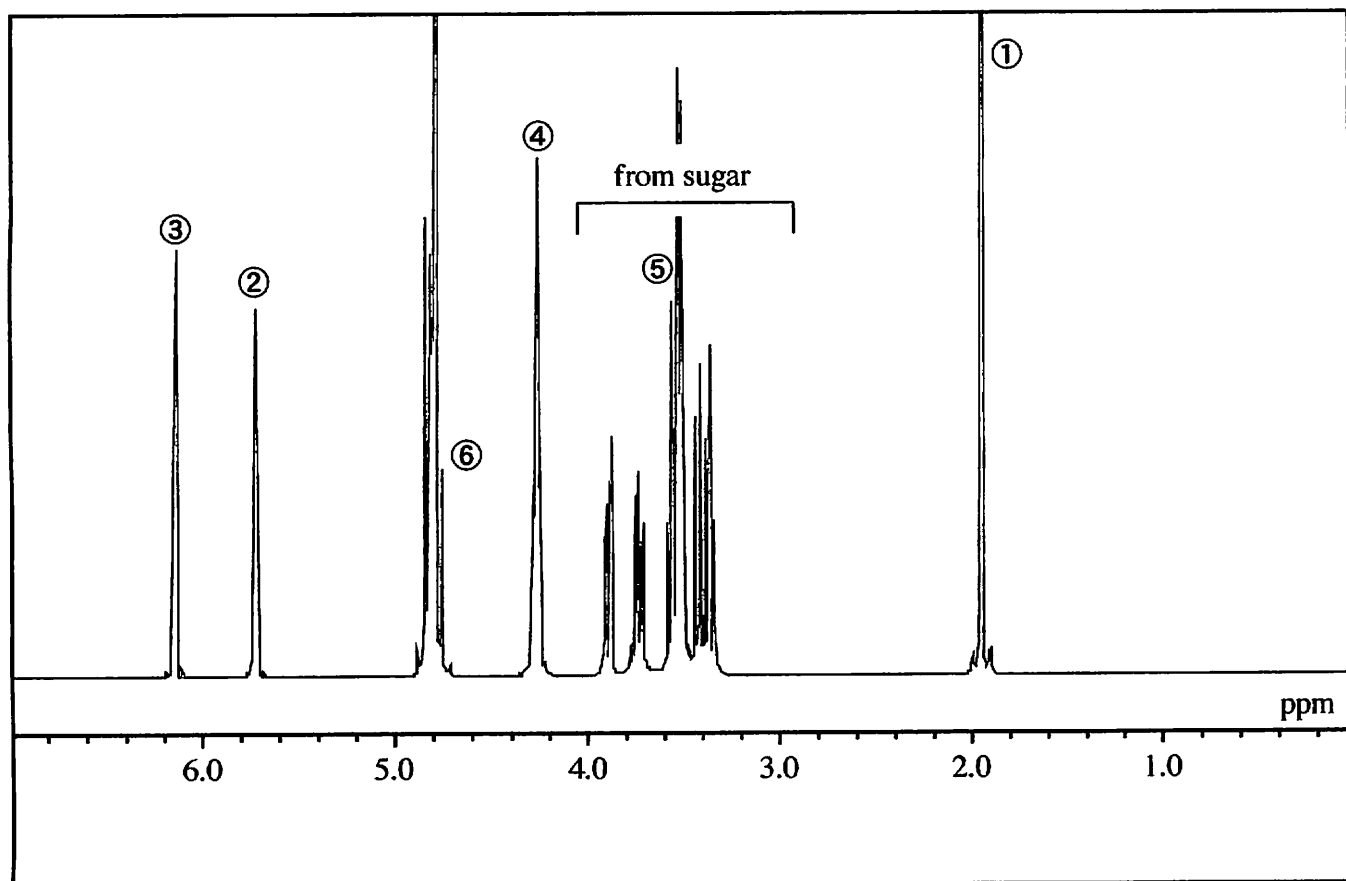
**Figure 2-7** FT-IR spectra of (a) glucosylamine and (b) 2-isocyanateethyl methacrylate (2-IEM)

(a) obtained product I



(b) obtained product II

**Figure 2-8** FT-IR spectra of (a) obtained product I and (b) obtained product II



	①	②	③	④	⑥	⑤ + from sugar
理論値	3.0	1.0	1.0	2.0	1.0	7.0
実測値	3.20	1.02	1.03	2.21	-	6.92

Figure 2-10 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of 2-(methacryloyloxy)ethylureido glucose

2-3 Cellobiose macromonomer の合成

2-3-1 cellobiosylamine の合成

cellobiose 10 g (29.25 mmol)を 300 ml ビーカー中, 水 150 ml に溶かし, 炭酸水素アンモニウムを 28.5g ずつ 24 時間毎, 4 回加え(全量 113 g), 開放したまま, 37 °C で 96 時間かきまぜた。その後, 蒸留水 200 ml を加え, 20 ml まで水を留去した後, 150 ml の水を加え, 10 ml まで濃縮した。この操作をアンモニア臭が消失するまで繰り返し, 凍結乾燥後, 白色固体を得た。元素分析値を Table 2-5 に示す。

Table 2-5 Elemental analysis of cellobiosylamine

	H (%)	C (%)	N (%)	C/N
Calcd.	6.79	42.2	4.10	10.3
Found	6.87	40.1	3.26	12.3

得られた白色固体と合成原料であるcellobioseの赤外吸収スペクトルをFigure 2-11に示す。得られた白色固体の赤外吸収スペクトルより原料のcellobioseには見られない, 1600 cm^{-1} 付近に, N-H変角振動に由来するピークが出現し, cellobioseへのアミノ基の導入が確認された。合成原料であるcellobiose, 得られた白色固体のHPLC分析を行った。クロマトグラムをFigure 2-12に示す。それぞれのピークの面積比より純度を算出したところ, 純度は81.0 % であった。合成原料であるcellobiose, 得られた合成化合物のcellobiosylamineのプロトン核磁気共鳴スペクトルをFigure 2-13, Figure 2-14に示す。Figure 2-13のcellobioseの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて, 4.6 ppm付近に β 型構造に由来するピーク, 5.2 ppm付近に α 型構造に由来するピーク, また4.5 ppm付近には α 型構造と β 型構造共通のピークが確認された。これらのピークのプロトン比より, α 型が35 %, β 型が65 % であると考えられる。Figure 2-14のcellobiosylamineの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいては, 4.1 ppm付近に β 型構造に由来するピーク, 4.3 ppm付近に α 型構造に由来するピークが確認された。1位の炭素原子にアミノ基が結合したことにより, 高磁場側にシフトしたと考えられる。また4.5 ppm付近には α 型構造と β 型構造共通のピークが確認され, 5.2 ppm付近にcellobioseの α 型構造に由来すると推測されるピークが確認された。これらの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの結果より, cellobiosylamineは合成されたと確認した。

2-3-2 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose の合成

先に合成したcellobiosylamine 10 g (純度81%, 23.73 mmol)を 1×10^{-3} M KOH水溶液 100 mlに溶解させた。その水溶液に、2-isocyanateethyl methacrylate (2-IEM)を9.20 g (59.33 mmol)を加えて、3 °Cに保ったまま12時間、激しくかき混ぜた。12時間後、フラスコ内に白色固体が析出していたため、これをろ過し固液分離した。固相はそのまま凍結乾燥し、5.577 gの白色物(a)を得た。液相は、未反応の2-IEMを除去するため、50 mlのジエチルエーテルを用いて4回洗浄し凍結乾燥を行った。凍結乾燥終了後、得られた白色固体を水2 ml, メタノール10 mlの、混合溶液に溶解させ、ジエチルエーテル80 mlとアセトン20 mlの混合溶液に滴下し冷却した。その後、G3ガラスフィルターでろ過し減圧乾燥した。8.780 gの白色物(b)を得た。白色物(b)の元素分析値をTable 2-6に示す。

Table 2-6 Elemental analysis of obtained 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose

	H (%)	C (%)	N (%)	C/N
Calcd.	6.49	45.9	5.64	8.15
Found	6.56	44.6	5.29	8.43

cellobiosylamine と得られた白色物(b)の FT-IR スペクトルを Figure 2-15 に示す。白色物(b)の FT-IR スペクトルでは cellobiosylamine には確認されない 1570 cm^{-1} に NH-CO-NH 相互伸縮, 1650 cm^{-1} に C=O (urea)伸縮振動, 1705 cm^{-1} に C=O (ester)伸縮振動に由来するピークが確認された。得られた白色物(b)の HPLC 分析を行った。クロマトグラムを Figure 2-16 に示す。Figure 2-16 に示すように cellobiosylamine のピークが消失し、新たに紫外可視領域に吸収を有する化合物の出現が認められた。これは目的生成物である 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose のビニル基に由来する吸収と考えられる。それぞれのピークの面積比より純度を算出したところ、純度は 74.5 %であった。白色物(b)の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを Figure 2-17 に示す。1.9 ppm にメチル基 (-CH₃), 4.2 ppm 付近にはメチレン基 (-CH₂-), 5.7 ppm と 6.1 ppm にはビニル基 (C=CH₂)に由来するピークが確認され、3.3~4.0 ppm 付近には糖骨格に由来するピークが確認された。

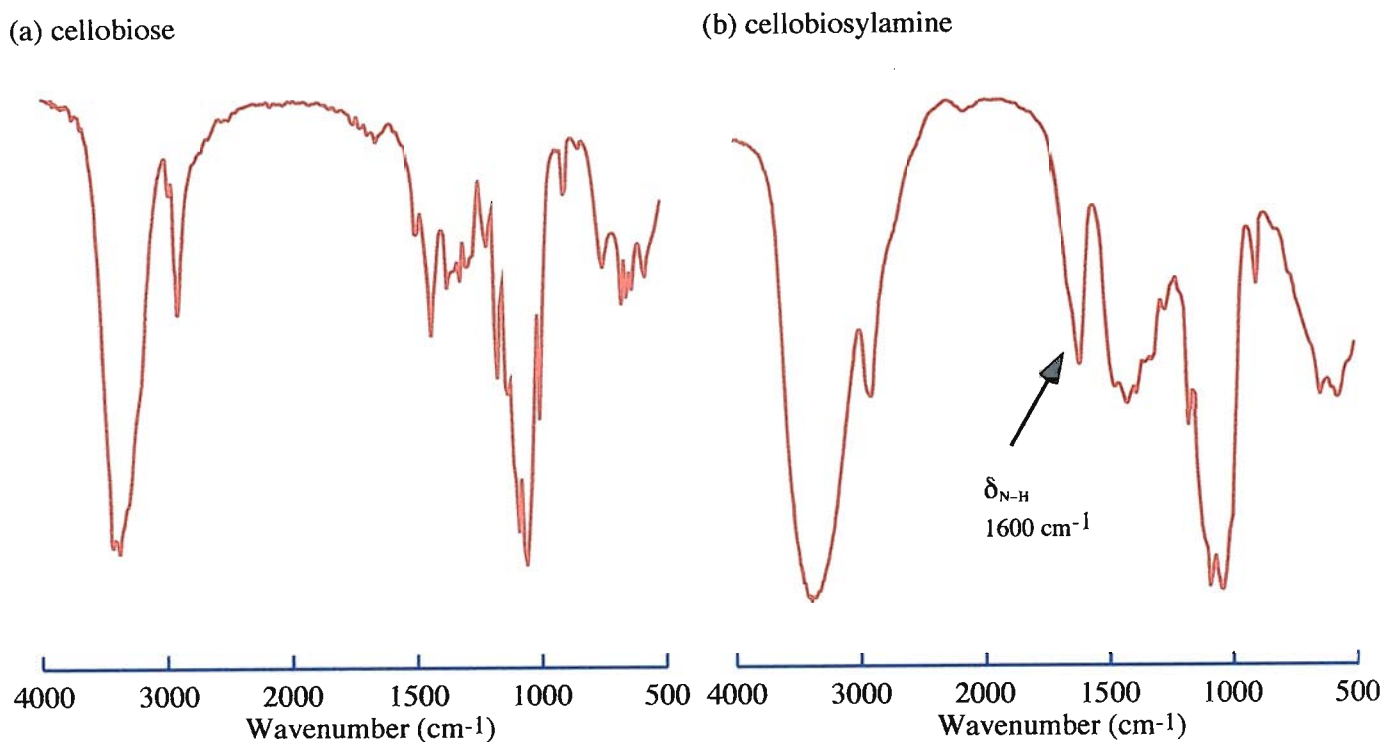


Figure 2-11 FT-IR spectra of (a) cellobiose and (b) obtained cellobiosylamine

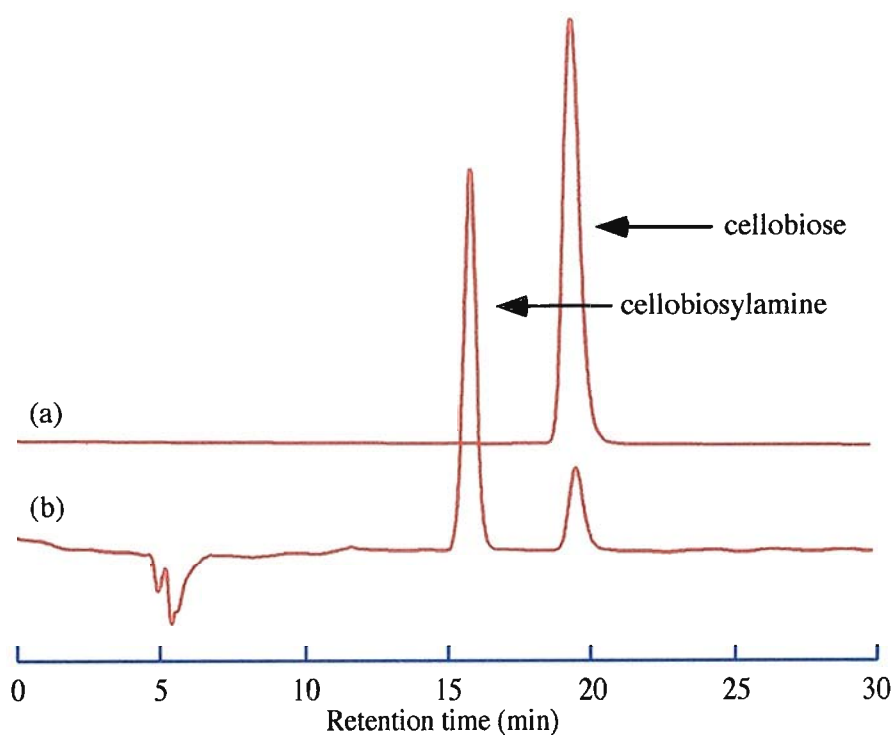


Figure 2-12 Chromatograms of (a) cellobiose and (b) obtained cellobiosylamine with Asahipak NH2P-50 (4.6 mm I.D. x 250 mm) at 20 °C. Mobile phase: Acetonitrile -water (7 : 3), flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.

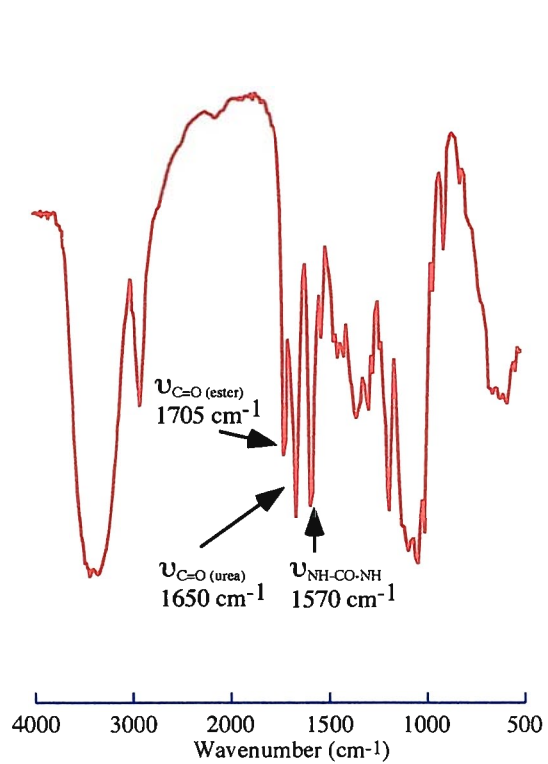


Figure 2-13 FT-IR spectrum of 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose

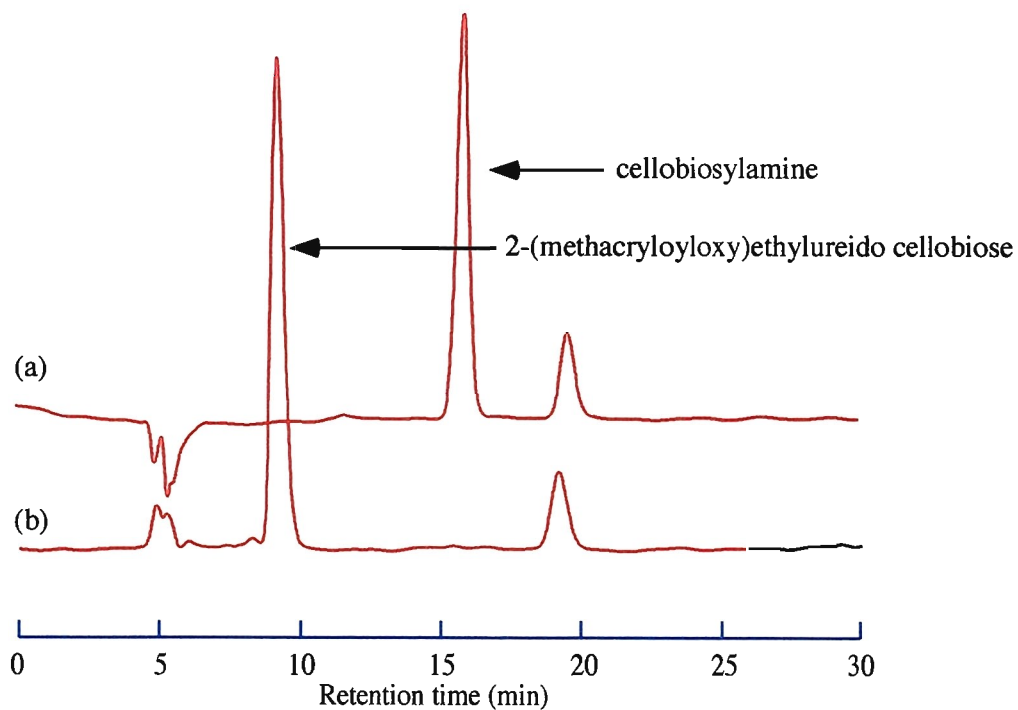
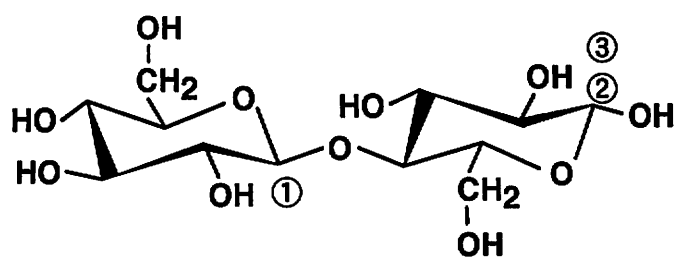
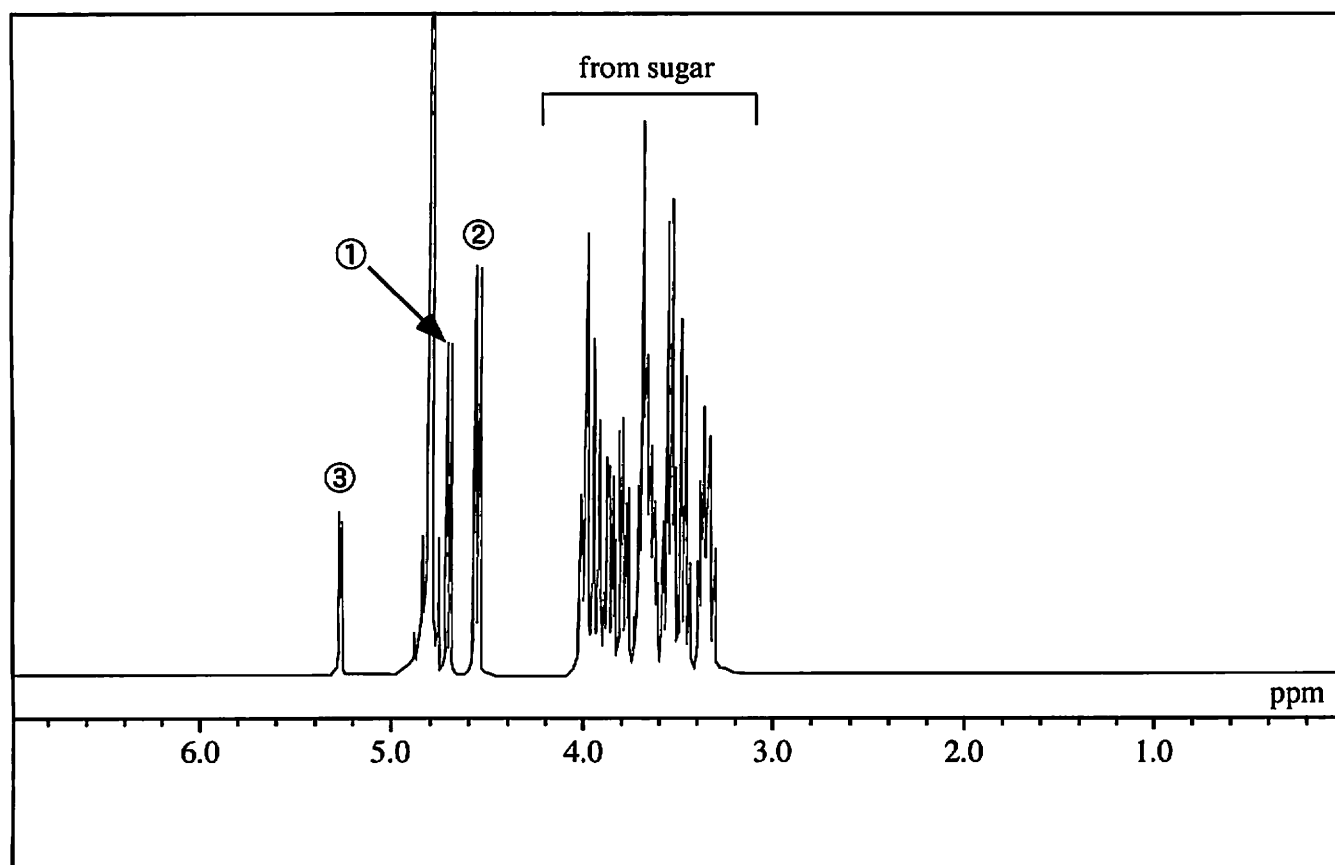
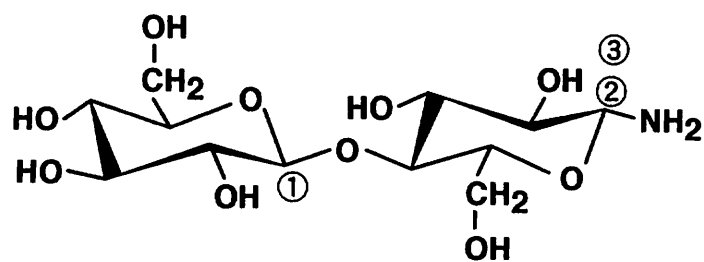
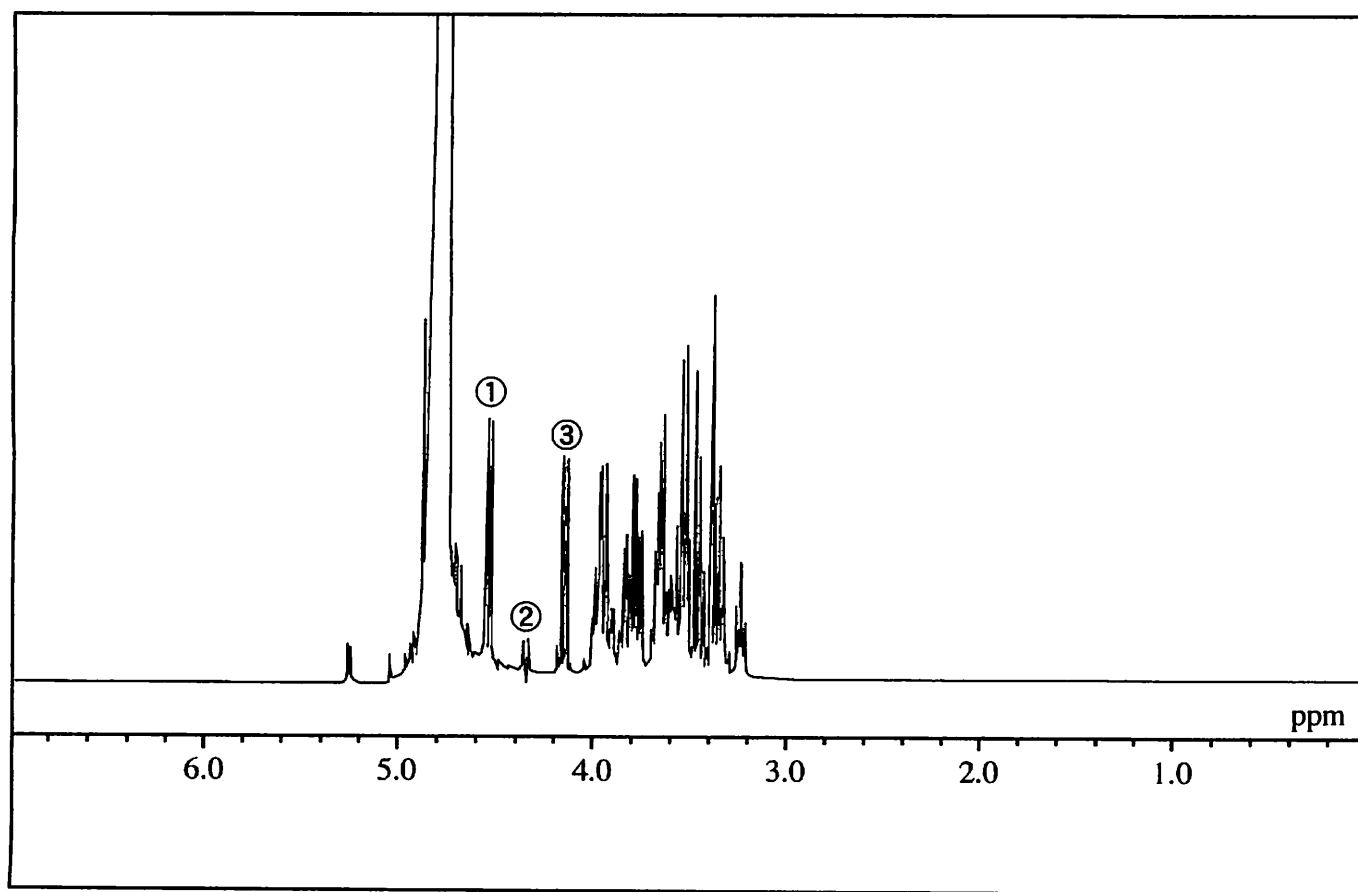


Figure 2-14 Chromatograms of (a) cellobiosylamine and (b) obtained 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose with Asahipak NH2P-50 (4.6 mm I.D. x 250 mm) at 20 °C. Mobile phase: Acetonitrile -water (7 : 3), flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.



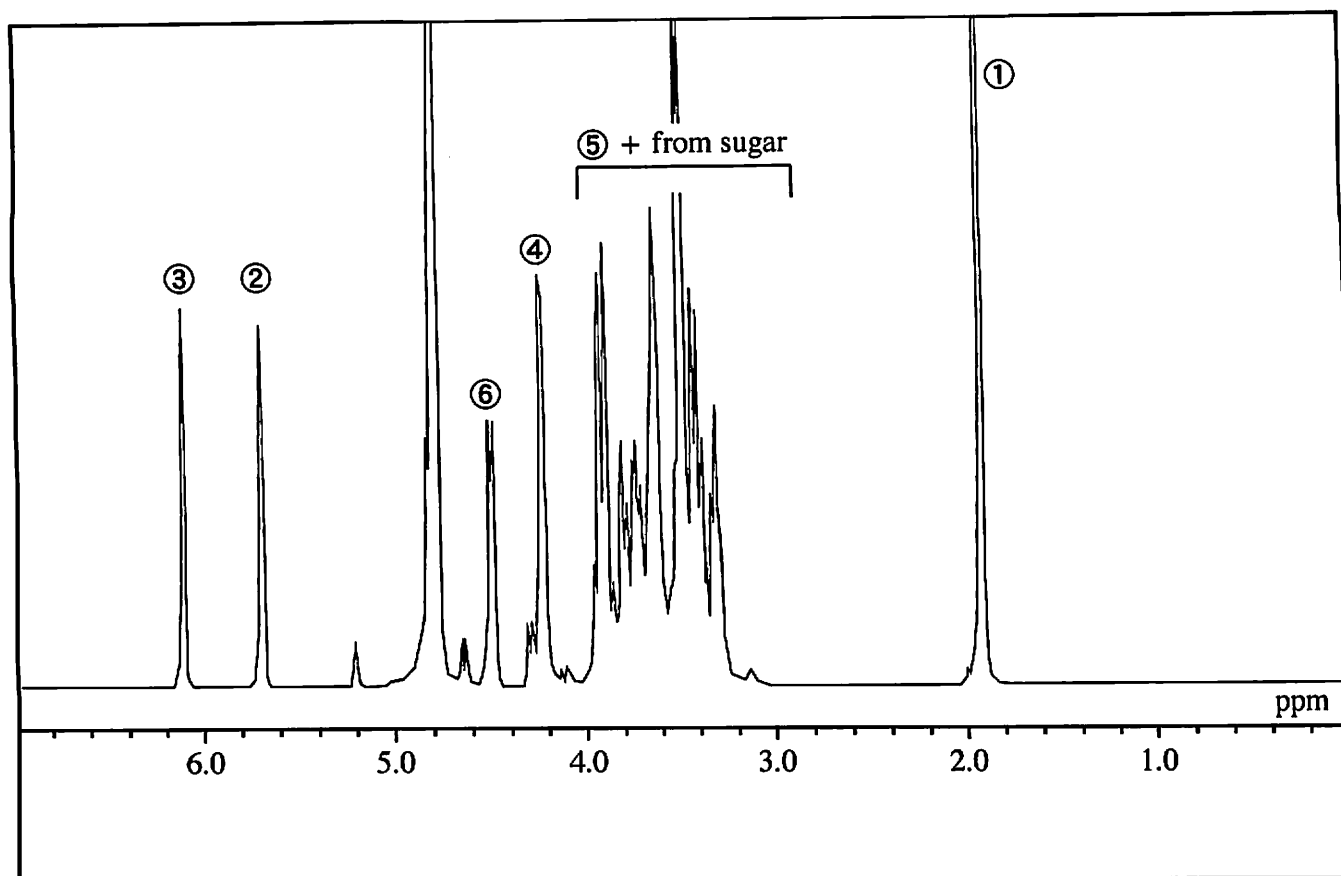
	①	② + ③	from sugar
理論値	1.0	1.0	12.0
実測値	1.03	1.10	11.2

Figure 2-13 ^1H -NMR spectrum of D-(+)-cellobiose



	①	② + ③	from sugar
理論値	1.0	1.0	12.0
実測値	1.0	1.09	13.5

Figure 2-14 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of obtained cellobiosylamine.



	①	②	③	④	⑥	⑤ + from sugar
理論値	3.0	1.0	1.0	2.0	1.0	14.0
実測値	3.03	1.04	0.96	2.10	1.0	15.9

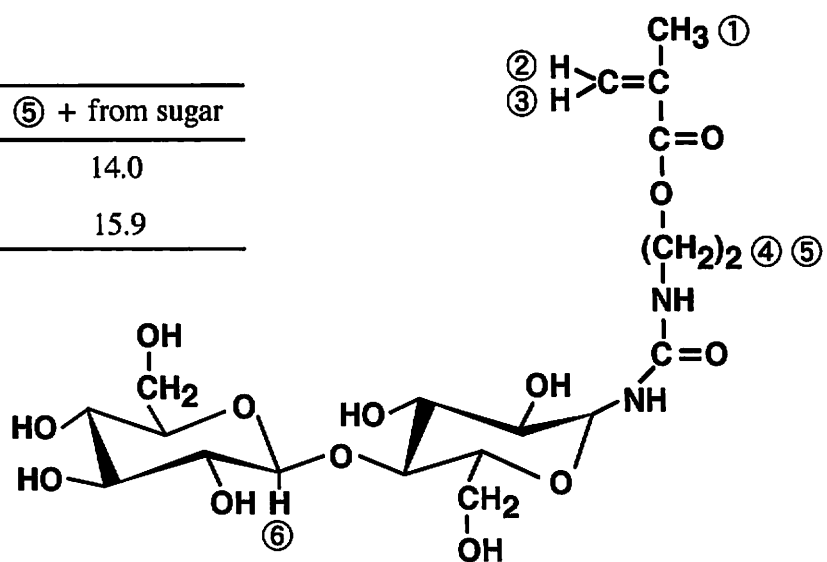


Figure 2-17 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose

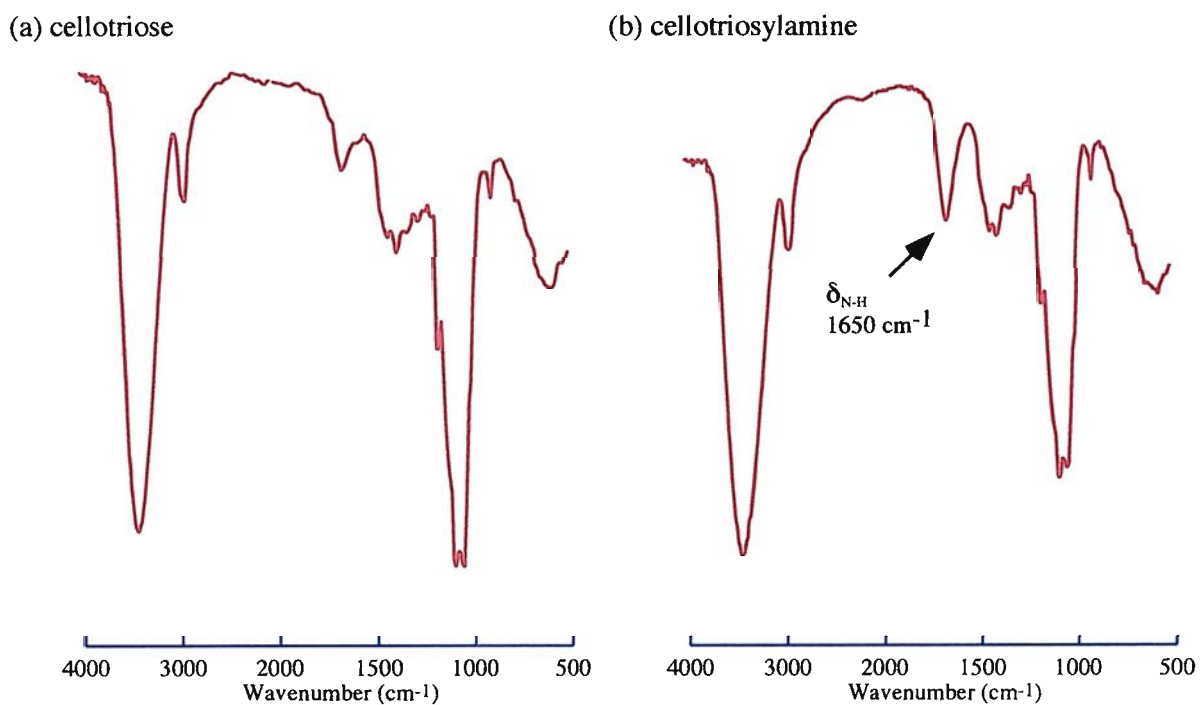


Figure 2-18 FT-IR spectra of (a) cellotriose and (b) obtained cellotriosylamine

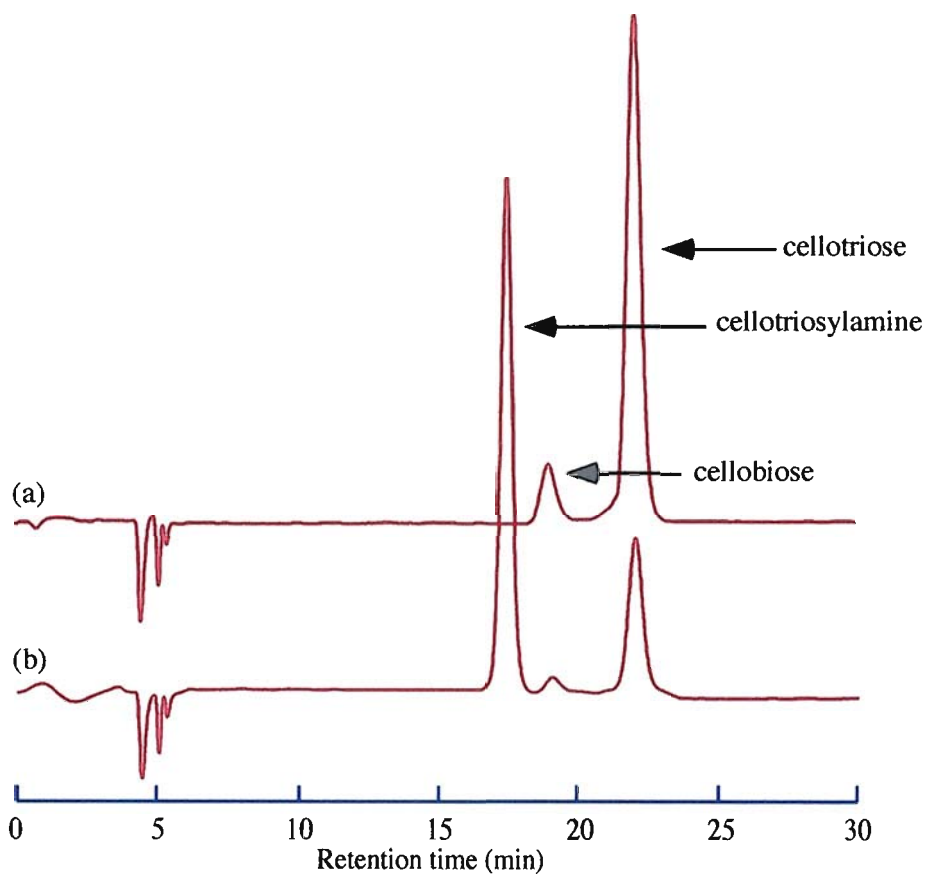


Figure 2-19 Chromatograms of (a) cellotriosylamine and (b) obtained cellotriose with Asahipak NH2P-50 (4.6 mm I.D. x 250 mm) at 20 °C. Mobile phase: Acetonitrile -water (7 : 3), flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.

2-4 Cellotriose macromonomer の合成

2-4-1 cellotriosylamine の合成

cellotriose 500 mg (0.99 mmol)を 100 ml ビーカー中, 水 30 ml に溶かし, 炭酸水素アンモニウムを 5.0 g ずつ 24 時間毎, 3 回加え(全量 15 g), 開放したまま, 37 °C で 96 時間かきまぜた。その後, 蒸留水 50 ml を加え, 10 ml まで水を留去した後, 50 ml の水を加え, 10 ml まで濃縮した。この操作をアンモニア臭が消失するまで繰り返し, 凍結乾燥後, 白色固体を得た。元素分析値を Table 2-7 に示す。

Table 2-7 Elemental analysis of cellotriosylamine

	H (%)	C (%)	N (%)	C/N
Calcd.	6.61	42.9	2.78	15.4
Found	6.50	41.0	1.75	23.4

得られた白色固体と合成原料である cellotriose の赤外吸収スペクトルを Figure 2-18 に示す。得られた白色固体の赤外吸収スペクトルより原料の cellotriose には見られない, 1650 cm^{-1} 付近に, N-H 変角振動に由来するピークが出現し, cellotriose へのアミノ基の導入が確認された。合成原料である cellotriose, 得られた白色固体の HPLC 分析を行った。クロマトグラムを Figure 2-19 に示す。それぞれのピークの面積比より純度を算出したところ, 純度は 74.8 % であった。合成原料である cellotriose, 得られた合成化合物の cellotriosylamine のプロトン核磁気共鳴スペクトルを Figure 2-20, Figure 2-21 に示す。Figure 2-20 の cellotriose の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて, 4.6 ppm 付近に β 型構造に由来するピーク, 5.2 ppm 付近に α 型構造に由来するピーク, また 4.5 ppm 付近には α 型構造と β 型構造共通のピークが確認された。Figure 2-21 の cellotriosylamine の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいては, 4.1 ppm 付近に原料にはない新規なピークが確認された。また 4.5 ppm, 5.2 ppm 付近に cellotriose の α 型及び β 型構造に由来するピークの減少が確認された。

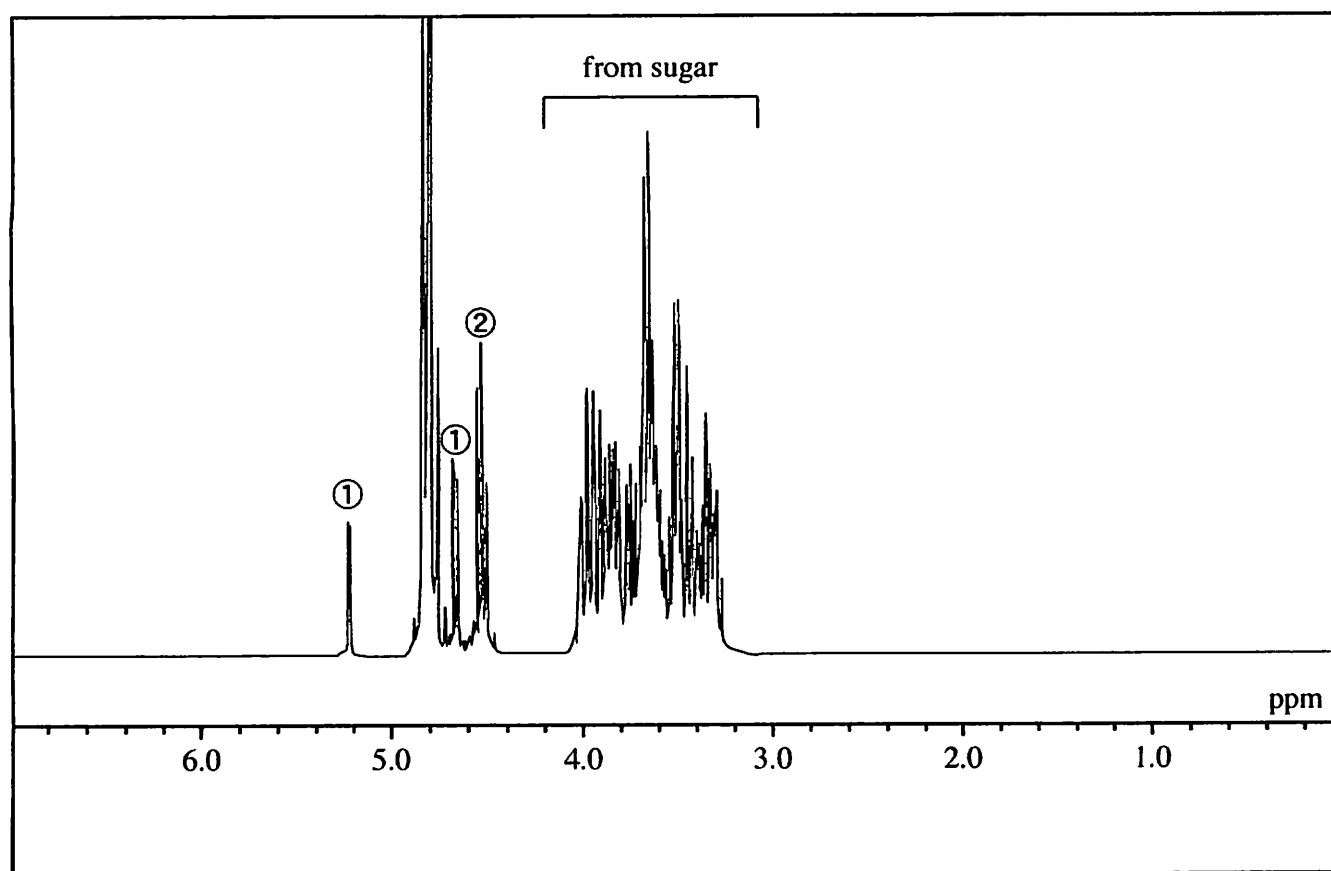
2-4-2 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellotriose (CMU)の合成

先に合成したcellotriosylamine 0.4 g (純度74.8 %, 0.59 mmol)を 1×10^{-3} M KOH水溶液 10 mlに溶解させた。その水溶液に, 2-isocyanateethyl methacrylate (2-IEM)を0.230 g (1.485 mmol)を加えて, 3 °Cに保ったまま12時間, 激しくかき混ぜた。12時間後, フラスコ内に白色固体が析出していたため, これをろ過し固液分離した。固相はそのまま凍結乾燥し, 0.11 gの白色物(a)を得た。液相は, 未反応の2-IEMを除去するため, 10 mlのジエチルエーテルを用いて4回洗浄し凍結乾燥を行った。凍結乾燥終了後, 得られた白色固体を水1.0 ml, メタノール5.0 mlの, 混合溶液に溶解させ, アセトン 100 mlに滴下し冷却した。その後, G3ガラスフィルターでろ過し減圧乾燥した。0.371 gの白色物(b)を得た。白色物(b)の元素分析値をTable 2-8に示す。

Table 2-8 Elemental analysis of obtained cellotriose vinyl monomer.

	H (%)	C (%)	N (%)	C/N
Calcd.	6.43	45.6	4.25	10.7
Found	6.17	41.3	2.43	16.9

cellotriosylamineと得られた白色物 (b)のFT-IRスペクトルをFigure 2-22に示す。白色物(b)のFT-IRスペクトルではcellotriosylamineには確認されない 1570 cm^{-1} にNH-CO-NH相互伸縮, 1650 cm^{-1} にC=O (urea)伸縮振動, 1705 cm^{-1} にC=O (ester)伸縮振動に由来するピークが確認された。得られた白色物(b)のHPLC分析を行った。クロマトグラムをFigure 2-23に示す。Figure 2-19に示すようにcellotriosylamineのピークが消失し, 新たに紫外可視領域に吸収を有する化合物の出現が認められた。これは目的生成物である2-(methacryloyl-oxy)ethylureido cellotrioseのビニル基に由来する吸収と考えられる。それぞれのピークの面積比より純度を算出したところ, 純度は79.2 %であった。白色物(b)の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルをFigure 2-24に示す。1.8 ppmにメチル基 (-CH₃), 4.2 ppm付近にはメチレン基 (-CH₂-), 5.7 ppmと6.1 ppmにはビニル基 (C=CH₂)に由来するピークが確認され, 3.3~4.0 ppm付近には糖骨格に由来するピークが確認された。



	①	②	from sugar
理論値	1.0	2.0	18.0
実測値	1.00	1.88	23.1

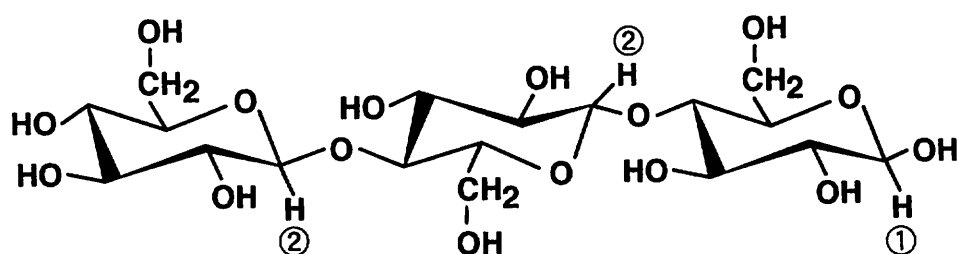
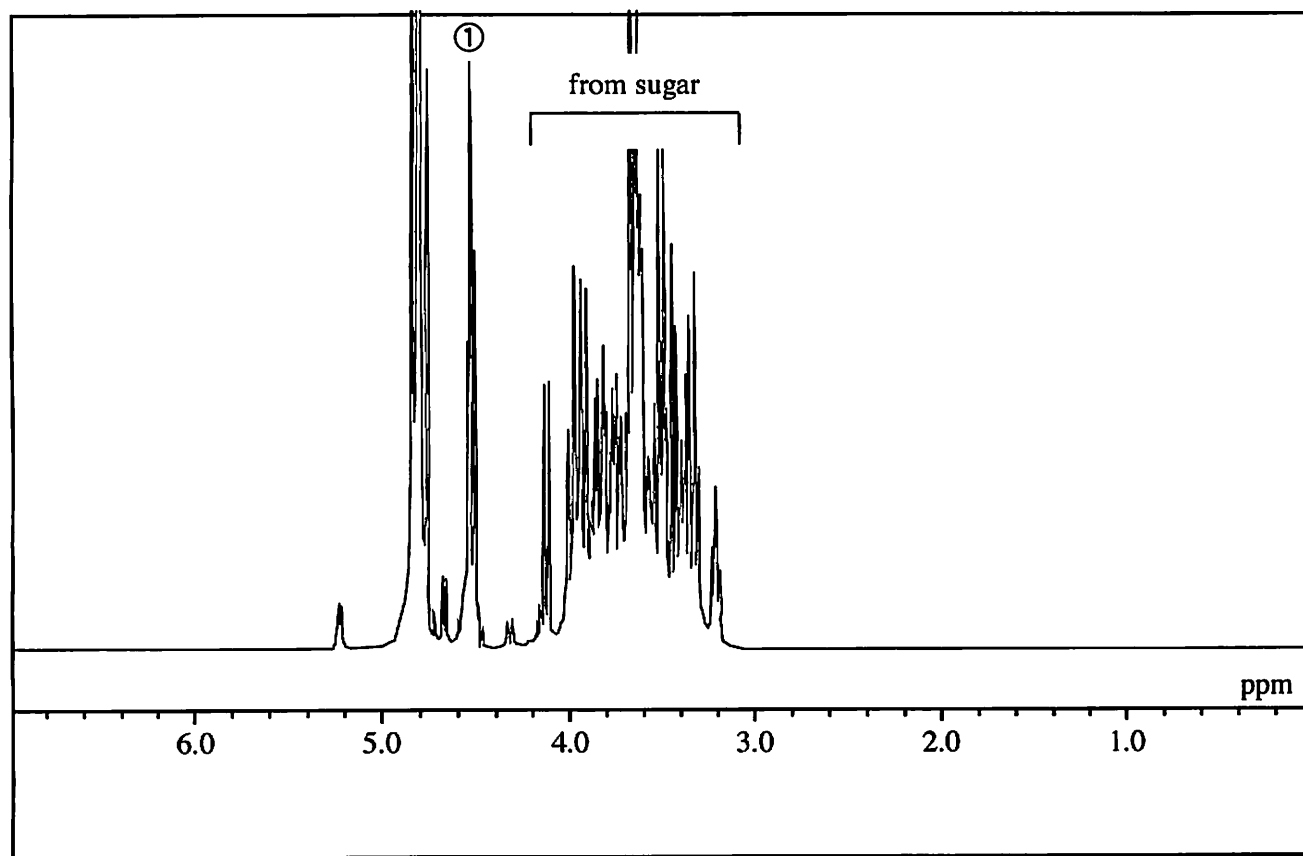


Figure 2-20 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of cellotriose



	①	from sugar
理論値	1.0	18.0
実測値	1.00	23.1

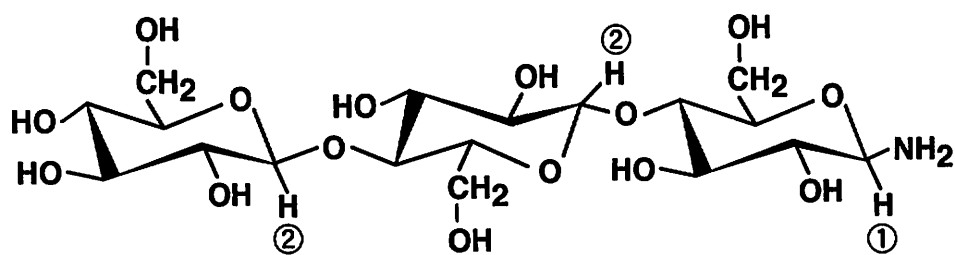


Figure 2-21 ^1H -NMR spectrum of cellotriosylamine

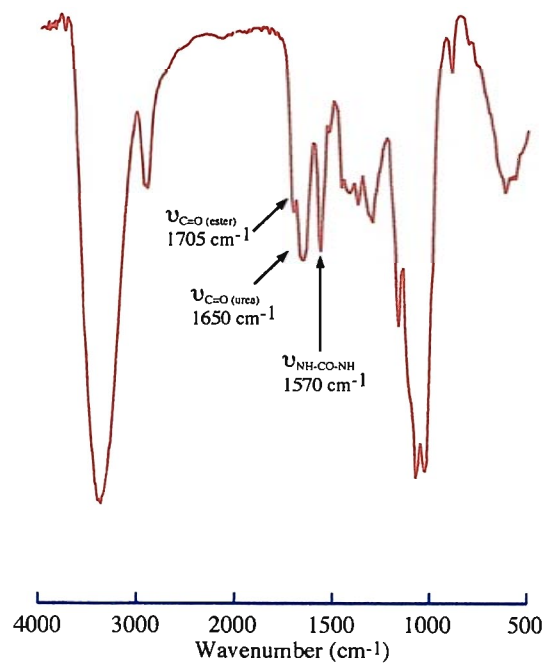


Figure 2-22 FT-IR spectrum of 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellulose

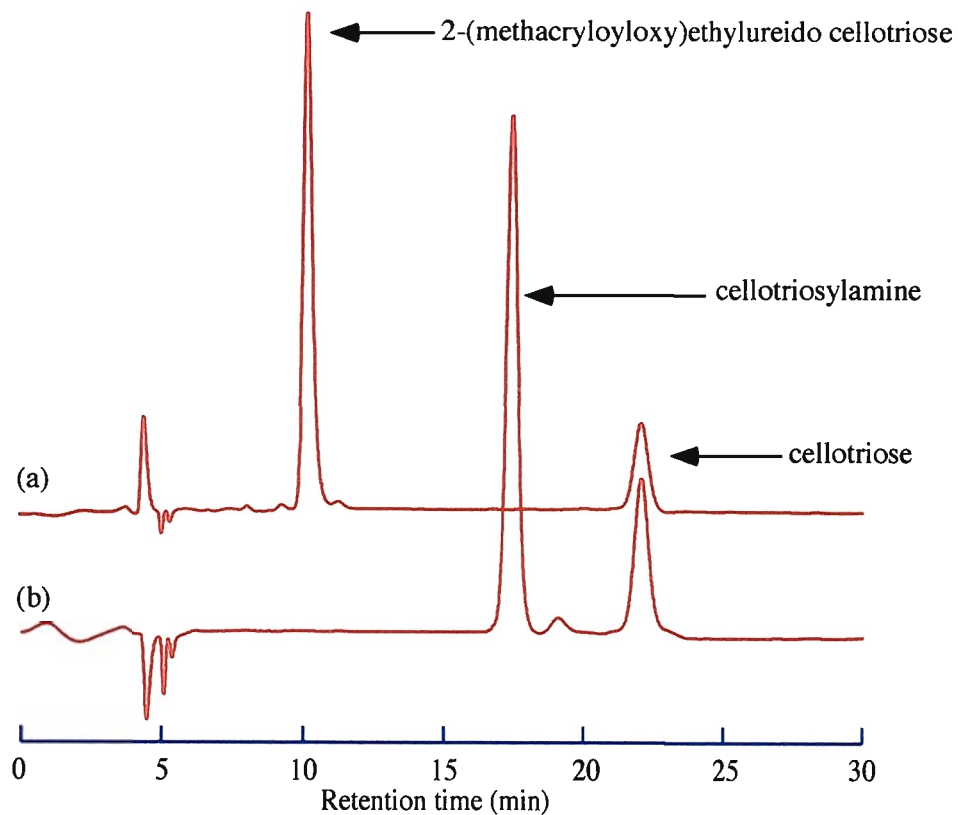
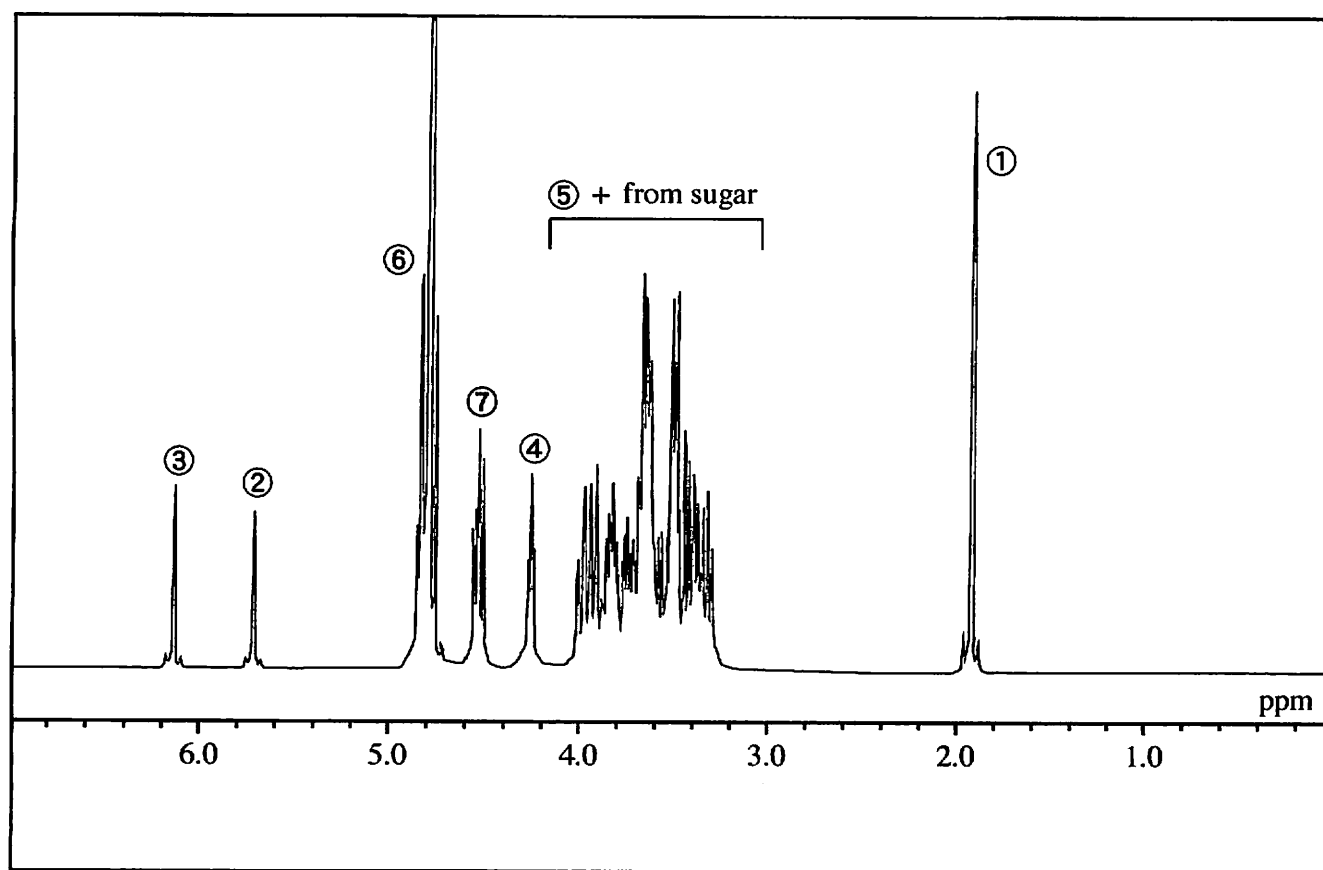


Figure 2-23 Chromatograms of (a) obtained 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellulose and (b) cellotriosylamine with Asahipak NH2P-50 (4.6 mm I.D. x 250 mm) at 20 °C. Mobile phase: Acetonitrile - water (7 : 3), flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.



	①	②	③	④	⑥	⑦	⑤ + from sugar
理論値	3.0	1.0	1.0	2.0	1.0	2.0	20.0
実測値	3.28	1.00	0.99	2.19	-	3.16	19.1

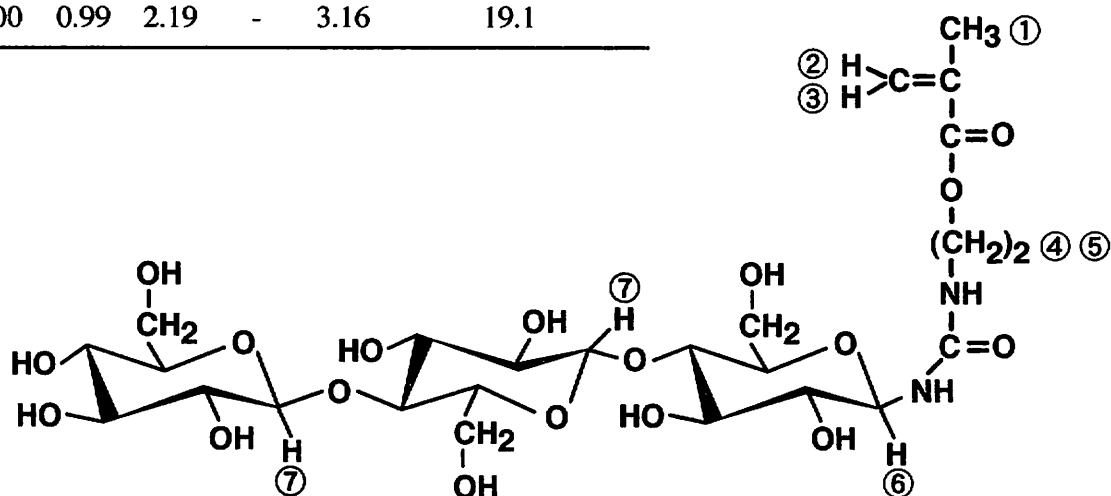


Figure 2-24 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellotriose

2-5 Maltose macromonomer の合成

2-5-1 maltosylamine の合成

maltose 10 g (29.25 mmol)を 300 ml ビーカー中, 水 150 ml に溶かし, 炭酸水素アンモニウムを 28.5 g ずつ 24 時間毎, 4 回加え(全量 113 g), 開放したまま, 37 °C で 96 時間かきまぜた。その後, 蒸留水 200 ml を加え, 20 ml まで水を留去した後, 150 ml の水を加え, 10 ml まで濃縮した。この操作をアンモニア臭が消失するまで繰り返し, 凍結乾燥後, 白色固体を得た。元素分析値を Table 2-9 に示す。

Table 2-9 Elemental analysis of maltosylamine

	H (%)	C (%)	N (%)	C/N
Calcd.	6.79	42.2	4.10	10.3
Found	6.66	39.1	3.02	12.9

得られた白色固体と合成原料の赤外吸収スペクトルを Figure 2-25 に示す。得られた白色固体の赤外吸収スペクトルより原料には見られない, 1600 ~ 1650 cm^{-1} 付近に, N-H 変角振動に由来するピークが確認された。従って, オリゴ糖にアミノ基の導入が確認された。加えて合成原料と, 得られた白色固体の HPLC 分析を行った。クロマトグラムを Figure 2-26 に示す。それぞれのピークの面積比より純度を算出したところ, 純度はそれぞれ 78.4 % であった。

合成原料である maltose, 得られた合成化合物の maltosylamine のプロトン核磁気共鳴スペクトルを Figure 2-27, Figure 2-28 に示す。Figure 2-27 の maltose の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて, 4.6 ppm 付近に β 型構造に由来するピーク, 5.2 ppm 付近に α 型構造に由来するピーク, また 5.4 ppm 付近には α 型構造と β 型構造共通のピークが確認された。これらのピークのプロトン比より, α 型が 15 %, β 型が 85 % であると考えられる。Figure 2-28 の maltosylamine の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいては, 4.1 ppm 付近に β 型構造に由来するピーク, 4.3 ppm 付近に α 型構造に由来するピークが確認された。1 位の炭素原子にアミノ基が結合したことにより, 高磁場側にシフトしたと考えられる。また 4.5 ppm 付近には α 型構造と β 型構造共通のピークが確認され, 5.2 ppm 付近に maltose の α 型構造に由来すると推測されるピークが確認された。これらの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの結果より, maltosylamine は合成されたと確認した

2-5-2 2-(methacryloyloxy)ethylureido maltotose の合成

先に合成した maltosylamine 5.0 g (純度78.4 %, 11.48 mmol) を 1×10^{-3} M KOH 水溶液 100 ml に溶解させた。その水溶液に, 2-isocyanateethyl methacrylate (2-IEM) を 4.45 g (28.71 mmol) を加えて, 3 °C に保ったまま 12 時間, 激しくかき混ぜた。12 時間後, フラスコ内に白色固体が析出していたため, これをろ過し固液分離した。固相はそのまま凍結乾燥し, 3.25 g の白色物(a)を得た。液相は, 未反応の 2-IEM を除去するため, 50 ml のジエチルエーテルを用いて 4 回洗浄し凍結乾燥を行った。凍結乾燥終了後, 得られた白色固体を水 2 ml, メタノール 10 ml の, 混合溶液に溶解させ, ジエチルエーテル 80 ml とアセトン 20 ml の混合溶液に滴下し冷却した。その後, G3 ガラスフィルターでろ過し減圧乾燥した。5.43 g の白色物(b)を得た。白色物(b)の元素分析値を Table 2-10 に示す。

Table 2-10 Elemental analysis of maltosylamine

	H (%)	C (%)	N (%)	C/N
Calcd.	6.79	42.2	4.10	10.3
Found	6.31	43.1	4.62	9.33

原料のアミノ化オリゴ糖と得られた白色物(b)の FT-IR スペクトルを Figure 2-29 に示す。白色物(b)の FT-IR スペクトルでは原料には確認されない 1570 cm^{-1} に NH-CO-NH 相互伸縮, 1650 cm^{-1} に C=O (urea)伸縮振動, 1705 cm^{-1} に C=O (ester)伸縮振動に由来するピークが確認された。また, 得られた白色物(b)の HPLC 分析を行った。クロマトグラムを Figure 2-30 に示す。Figure 2-11, 12 に示すように maltosylamine のピークが消失し, 新たに紫外可視領域に吸収を有する化合物の出現が認められた。これは目的生成物である 2-(methacryloyl-oxy)ethylureido maltose のビニル基に由来する吸収と考えられる。ピークの面積比より純度を算出したところ, 純度は 65.0 % であった。加えて, 白色物(b)の $^1\text{H-NMR}$ を Figure 2-31 に示す。1.9 ppm にメチル基 (-CH₃), 4.2 ppm 付近にはメチレン基 (-CH₂-), 5.7 ppm と 6.1 ppm にはビニル基 (C=CH₂)に由来するピークが確認され, 3.3~4.0 ppm 付近には糖骨格に由来するピークが確認された。

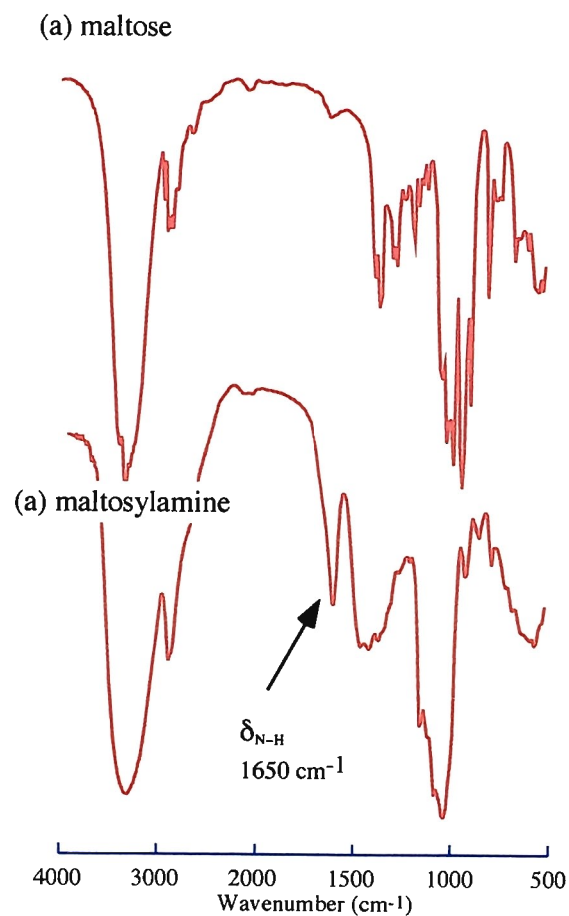


Figure 2-25 FT-IR spectra of (a) maltose and (b) maltosylamine

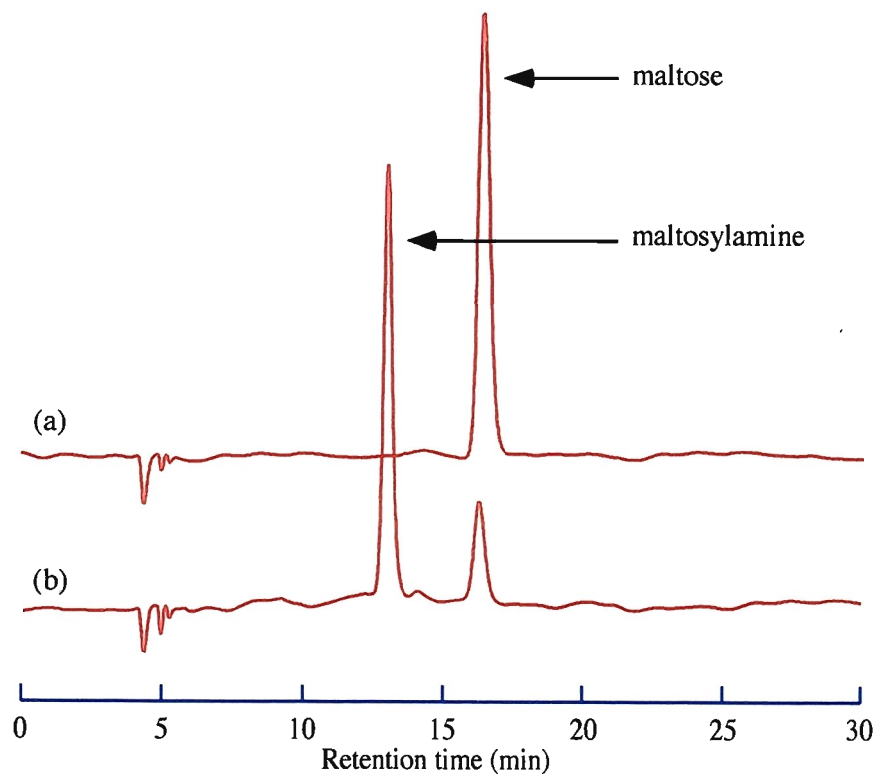
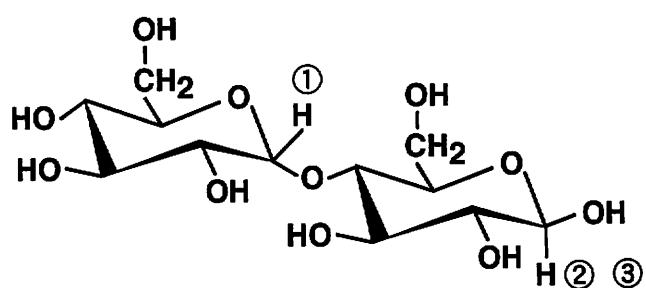
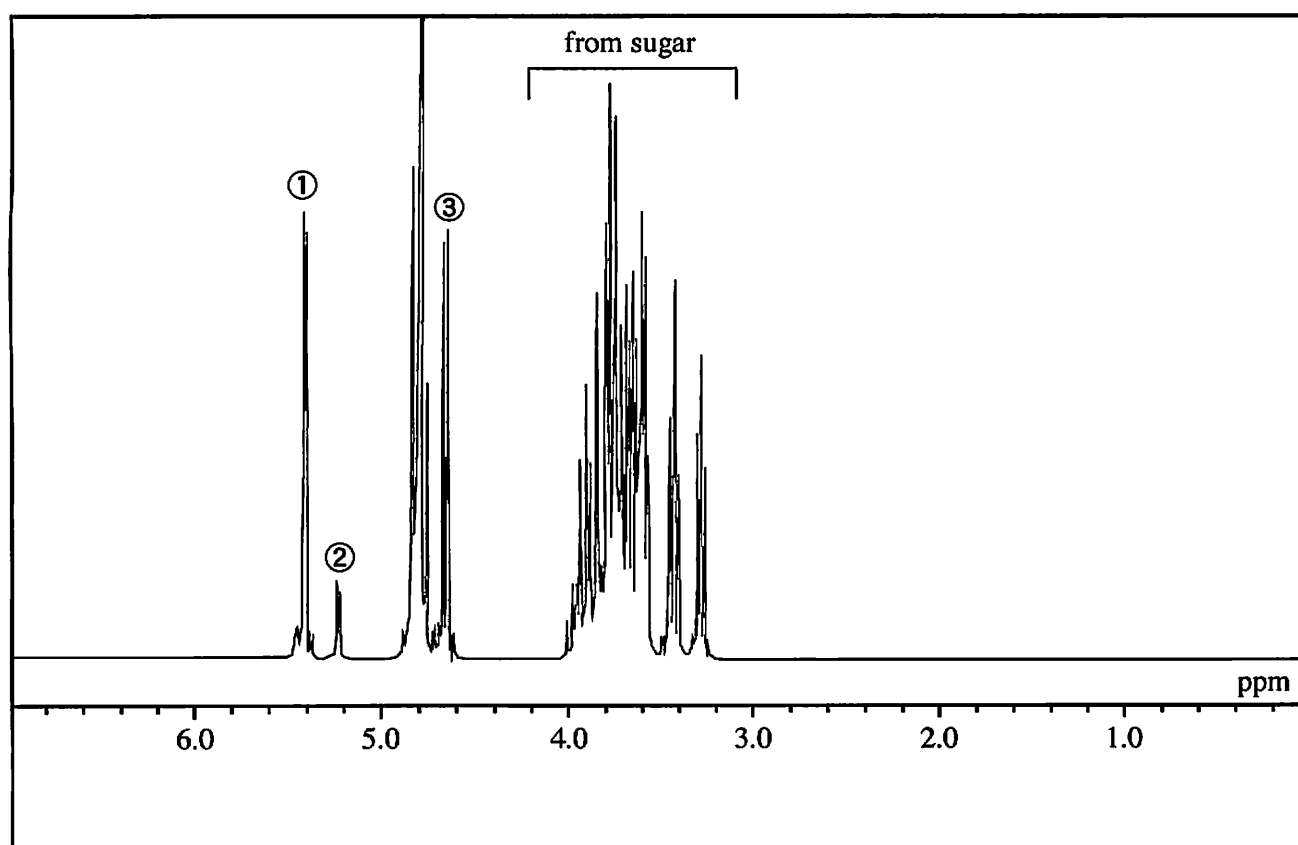
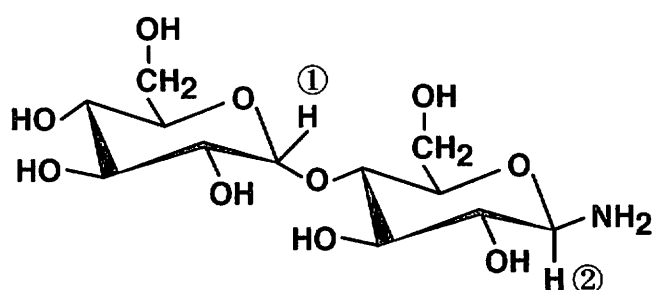
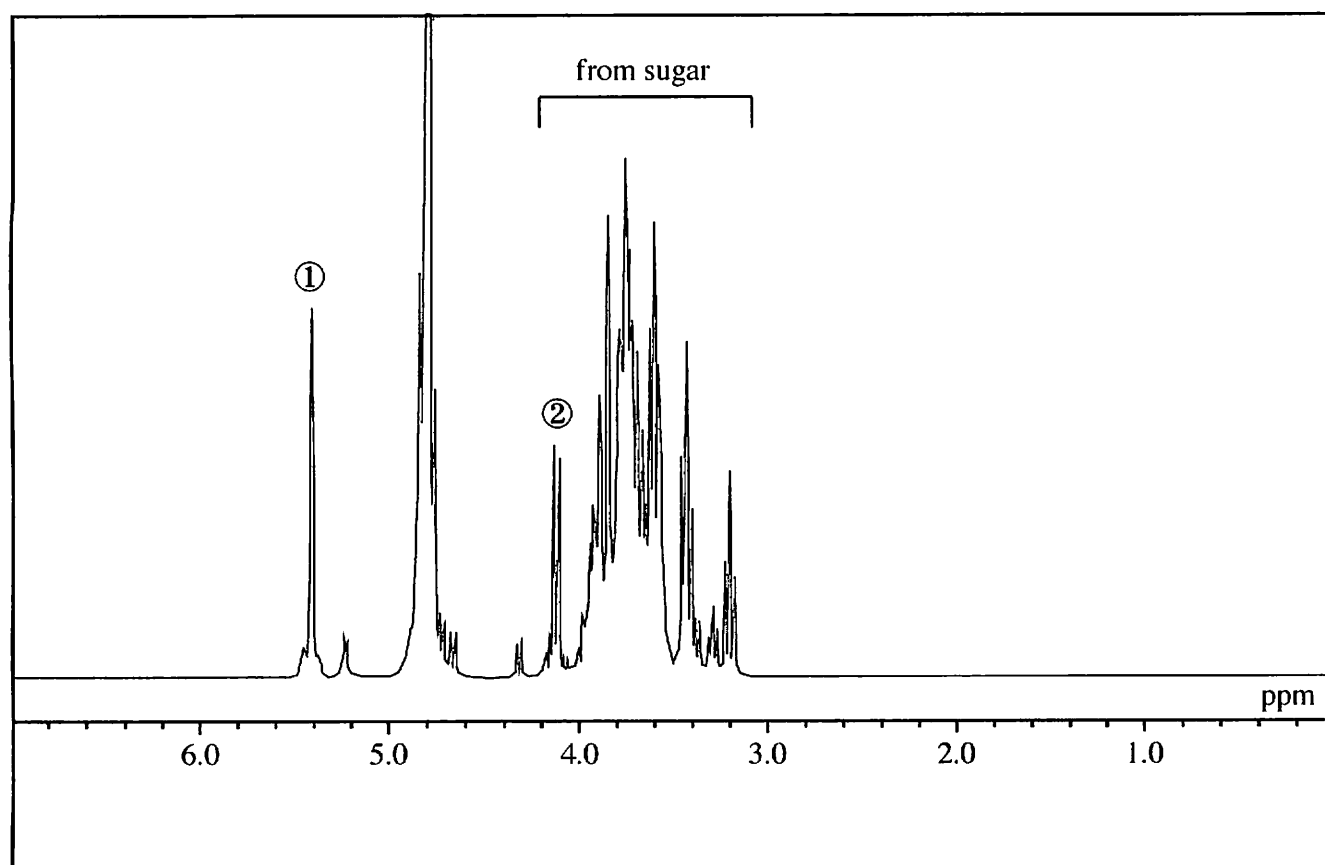


Figure 2-26 Chromatograms of (a) maltose and (b) obtained maltosylamine with Asahipak NH2P-50 (4.6 mm I.D. x 250 mm) at 20 °C. Mobile phase: Acetonitrile -water (7 : 3), flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.



	①	② + ③	from sugar
理論値	1.0	1.0	12.0
実測値	1.00	0.95	11.9

Figure 2-27 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of D-(+)-maltose



	①	② +	from sugar
理論値	1.0		13.0
実測値	1.00		13.2

Figure 2-28 ^1H -NMR spectrum of maltosylamine

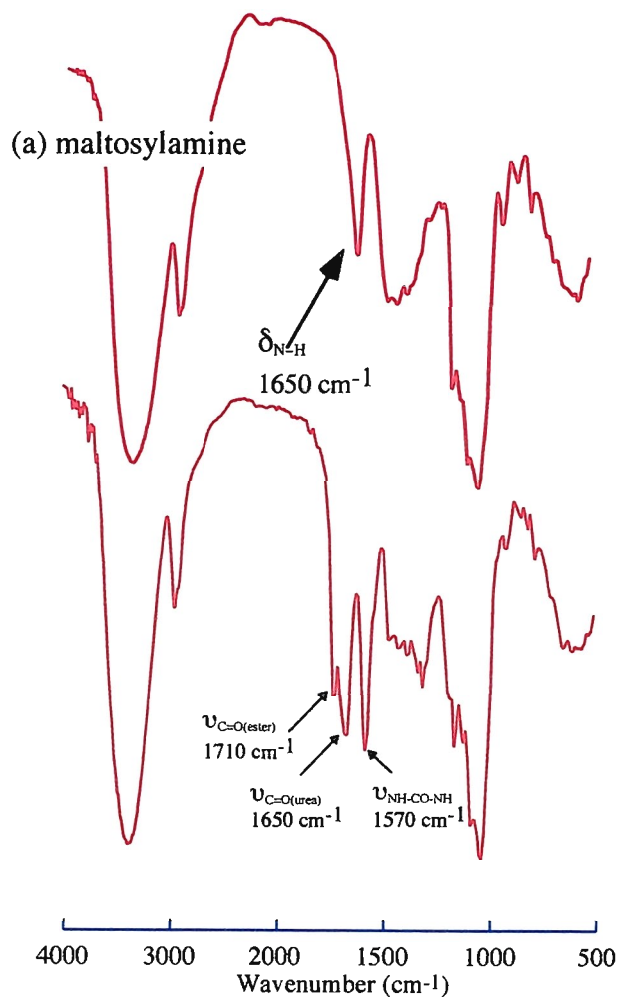


Figure 2-29 FT-IR spectra of (a) maltosylamine and (b) obtained 2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose

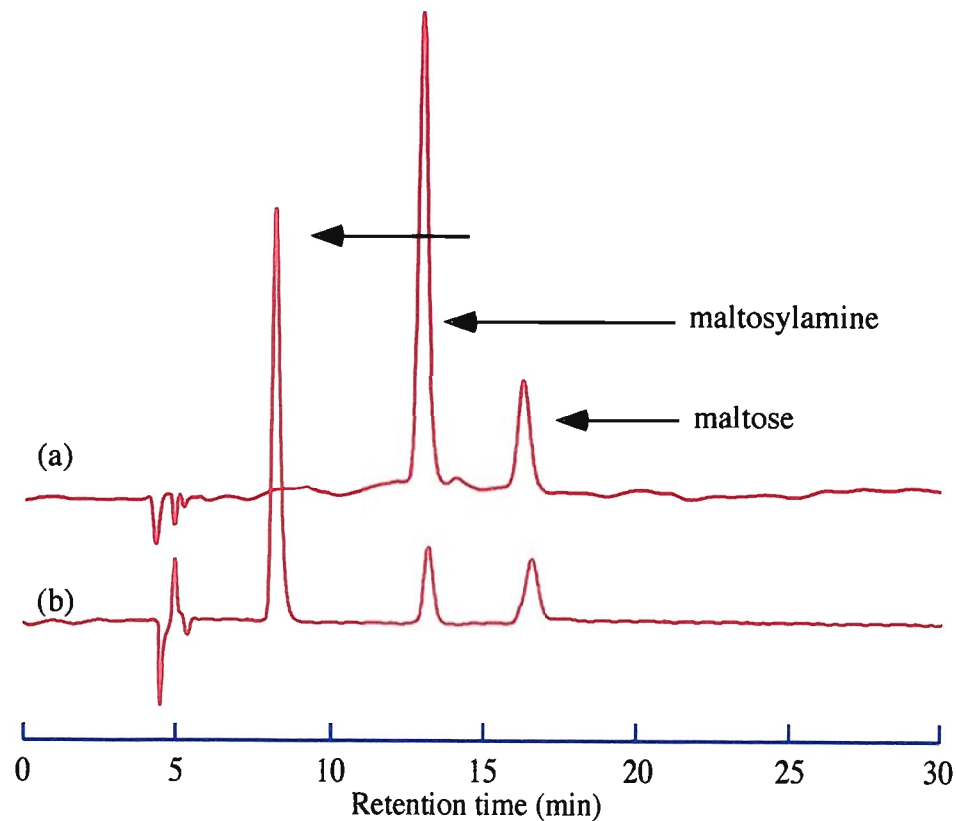
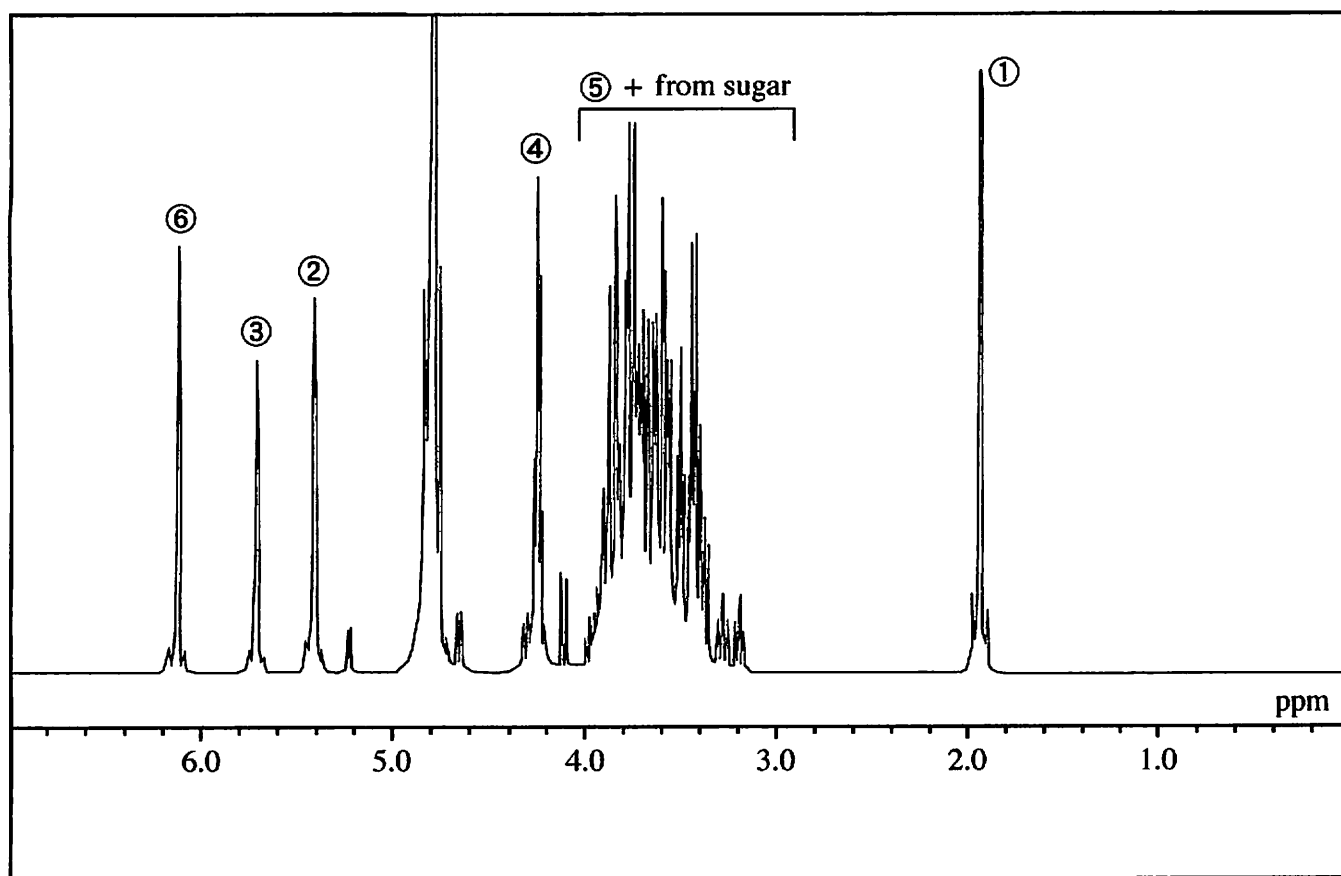


Figure 2-30 Chromatograms of (a) maltosylamine and (b) obtained 2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose with Asahipak NH2P-50 (4.6 mm I.D. x 250 mm) at 20 °C. Mobile phase: Acetonitrile -water (7 : 3), flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.



	①	②	③	④	⑥	⑤ + from sugar
理論値	3.0	1.0	1.0	2.0	1.0	14.0
実測値	3.47	1.00	1.09	2.26	1.0	14.4

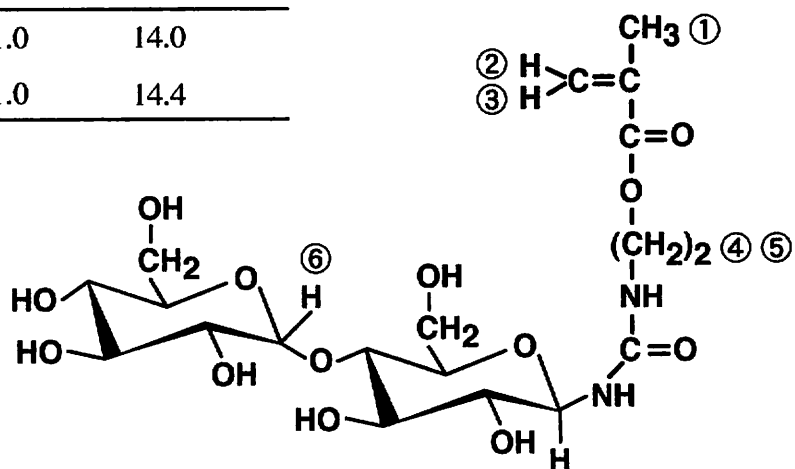


Figure 2-31 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of 2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose

2-6 Maltotriose macromonomer の合成

2-6-1 maltotriosylamine の合成

maltotriose 2.0 g (3.96 mmol)を 100 ml ビーカー中、水 30 ml に溶かし、炭酸水素アンモニウムを 5.0 g ずつ 24 時間毎、3 回加え(全量 15 g)、開放したまま、37 °C で 96 時間かきまぜた。その後、蒸留水 50 ml を加え、10 ml まで水を留去した後、50 ml の水を加え、10 ml まで濃縮した。この操作をアンモニア臭が消失するまで繰り返し、凍結乾燥後、白色固体を得た。元素分析値を Table 2-11 に示す。

Table 2-11 Elemental analysis of maltotriosylamine

	H (%)	C (%)	N (%)	C/N
Calcd.	6.61	42.9	2.78	15.4
Found	6.46	41.3	1.57	26.3

得られた白色固体と合成原料の赤外吸収スペクトルを Figure 2-32 に示す。得られた白色固体の赤外吸収スペクトルより原料には見られない、 $1600 \sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ 付近に、N-H 変角振動に由来するピークが確認された。従って、オリゴ糖にアミノ基の導入が確認された。合成原料と、得られた白色固体の HPLC 分析を行った。クロマトグラムを Figure 2-33 に示す。それぞれのピークの面積比より純度を算出したところ、純度は 74.6 %であった。また、maltotriose、得られた合成化合物の maltotriosylamine のプロトン核磁気共鳴スペクトルを Figure 2-34, Figure 2-35 に示す。Figure 2-34 の maltotriose の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、4.6 ppm 付近に β 型構造に由来するピーク、5.2 ppm 付近に α 型構造に由来するピーク、また 4.5 ppm 付近には α 型構造と β 型構造共通のピークが確認された。Figure 2-35 の maltotriosylamine の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいては、4.1 ppm 付近に原料にはない新規なピークが確認された。

6-2-2-2 2-(methacryloyloxy)ethylureido maltotriose の合成

先に合成した maltotriosylamine 1.0 g (純度 74.6 %, 1.48 mmol) を 1×10^{-3} M KOH 水溶液 20 ml に溶解させた。その水溶液に、2-isocyanateethyl methacrylate (2-IEM) を 0.572 g (3.72 mmol) を加えて、3 °C に保ったまま 12 時間、激しくかき混ぜた。12 時間後、フラスコ内に白色固体が析出していたため、これをろ過し固液分離した。固相はそのまま凍結乾燥し、0.34 g の白色物(a)を得た。液相は、未反応の 2-IEM を除去するため、10 ml のジエチルエーテルを用いて 4 回洗浄し凍結乾燥を行った。凍結乾燥終了後、得られた白色固体を水 1.0 ml, メタノール 5.0 ml の、混合溶液に溶解させ、アセトン 100 ml に滴下し冷却した。その後、G3 ガラスフィルターでろ過し減圧乾燥した。1.24 g の白色物(b)を得た。白色物(b)の元素分析値を Table 2-12 に示す。

Table 2-12 Elemental analysis of obtained 2-(methacryloyloxy)ethylureido maltotriose

	H (%)	C (%)	N (%)	C/N
Calcd.	6.43	45.6	4.25	10.7
Found	6.32	41.0	2.43	16.9

原料のアミノ化オリゴ糖と得られた白色物(b)の FT-IR スペクトルを Figure 2-36 に示す。白色物(b)の FT-IR スペクトルでは原料には確認されない 1570 cm^{-1} に NH-CO-NH 相互伸縮, 1650 cm^{-1} に C=O (urea)伸縮振動, 1705 cm^{-1} に C=O (ester)伸縮振動に由来するピークが確認された。得られた白色物(b)の HPLC 分析を行った。クロマトグラムを Figure 2-37 に示す。Figure 2-11, 12 に示すように maltotriosylamine のピークが消失し、新たに紫外可視領域に吸収を有する化合物の出現が認められた。これは目的生成物である 2-(methacryloyl-oxy)ethylureido maltotriose のビニル基に由来する吸収と考えられる。ピークの面積比より純度を算出したところ、純度は 82.3 % であった。白色物(b)の $^1\text{H-NMR}$ を Figure 2-38 に示す。1.9 ppm にメチル基 ($-\text{CH}_3$), 4.2 ppm 付近にはメチレン基 ($-\text{CH}_2-$), 5.7 ppm と 6.1 ppm にはビニル基 ($\text{C}=\text{CH}_2$)に由来するピークが確認され、3.3~4.0 ppm 付近には糖骨格に由来するピークが確認された。

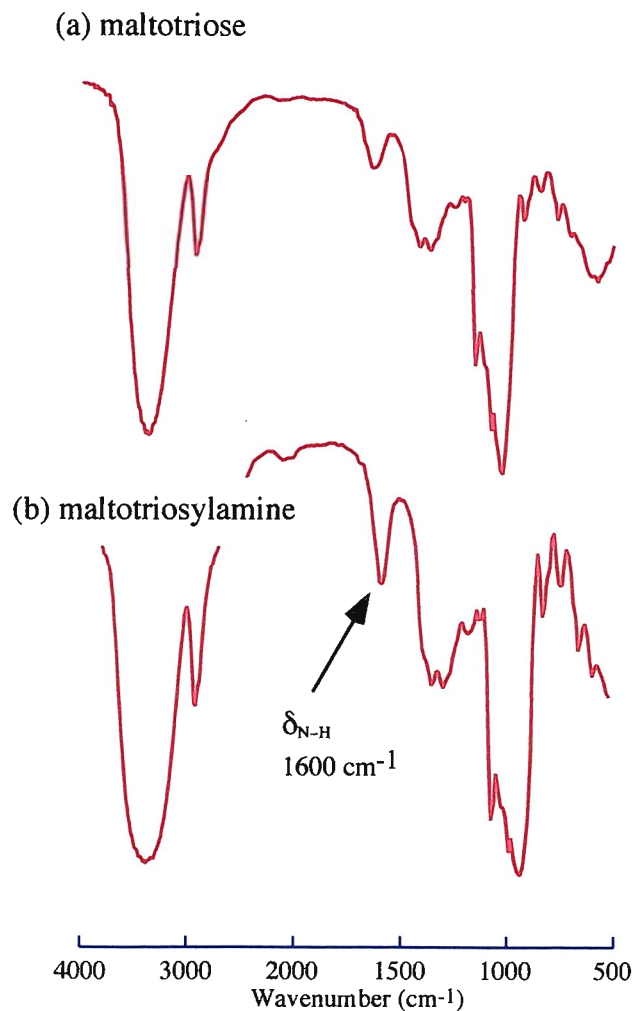


Figure 2-32 FT-IR spectra of (a) maltotriose, (b) maltotriosylamine

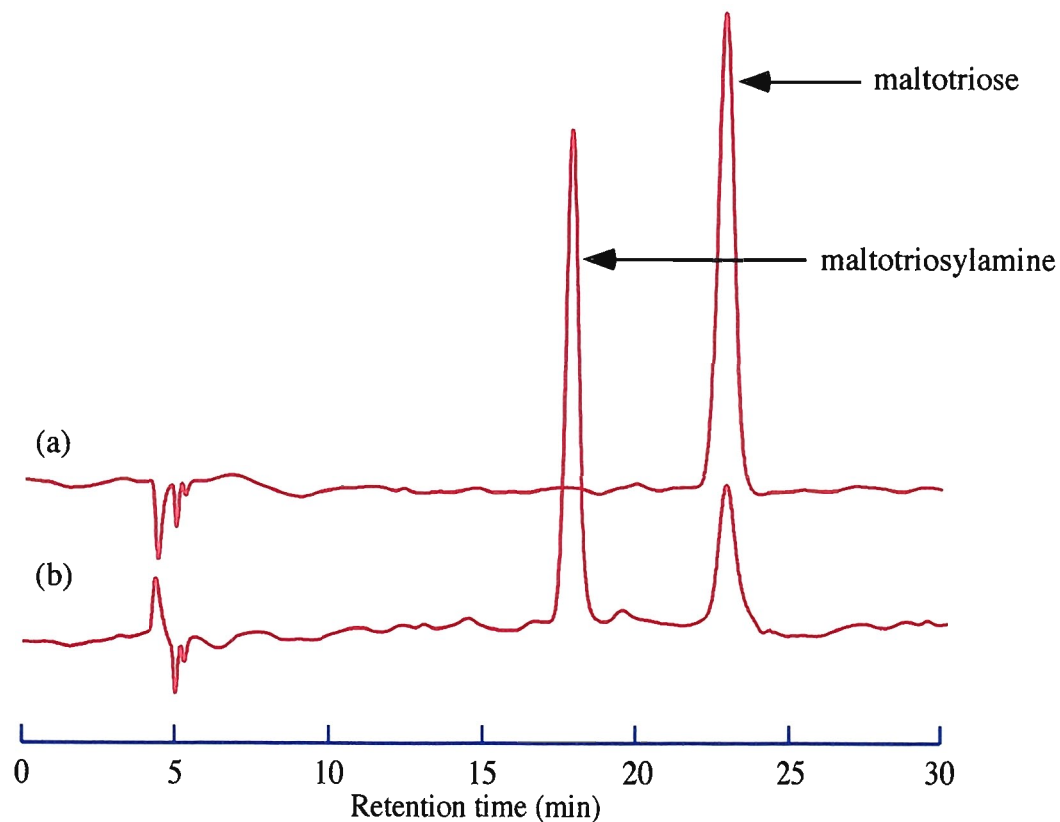
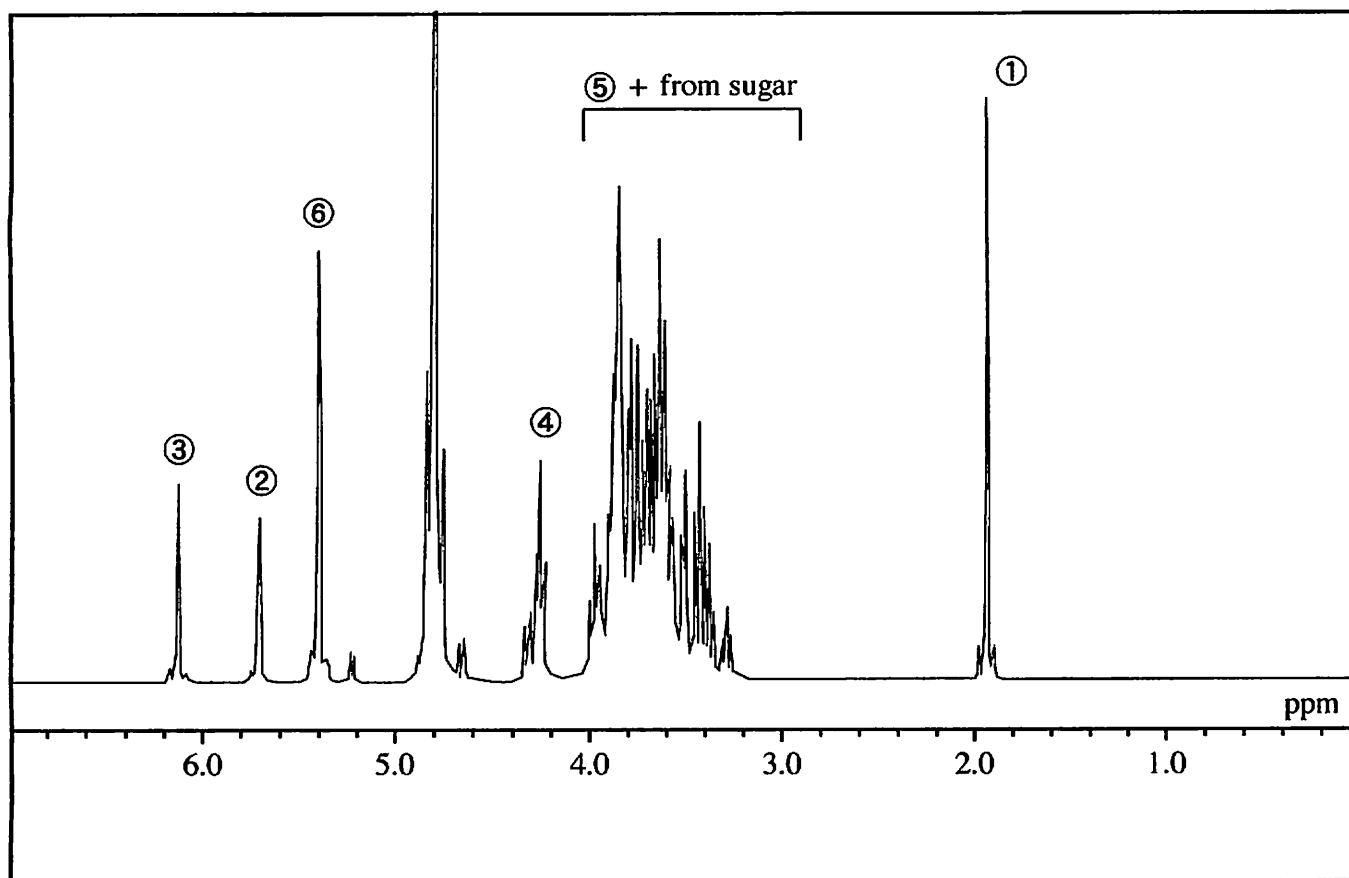


Figure 2-33 Chromatograms of (a) maltotriose and (b) obtained maltotriosylamine with Asahipak NH2P-50 (4.6 mm I.D. x 250 mm) at 20 °C. Mobile phase: Acetonitrile -water (7 : 3), flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.



	①	②	③	④	⑥	⑤ + from sugar
理論値	3.0	1.0	1.0	2.0	2.0	20.0
実測値	3.10	1.00	1.02	2.29	3.60	18.8

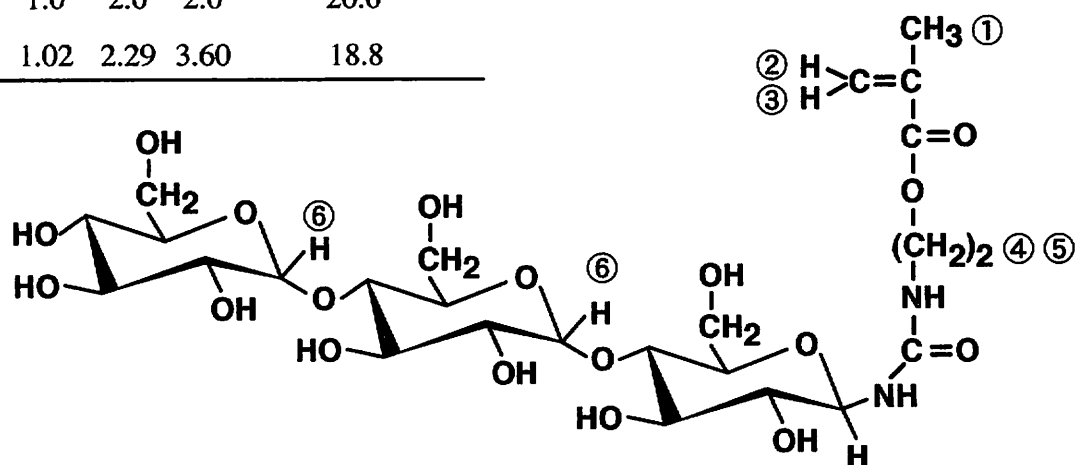
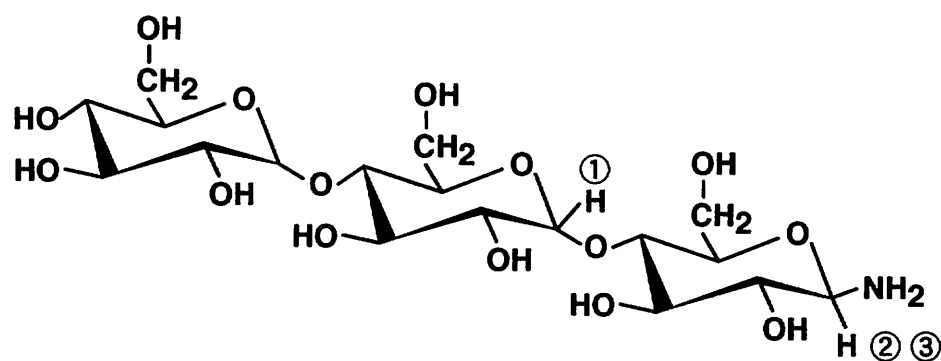
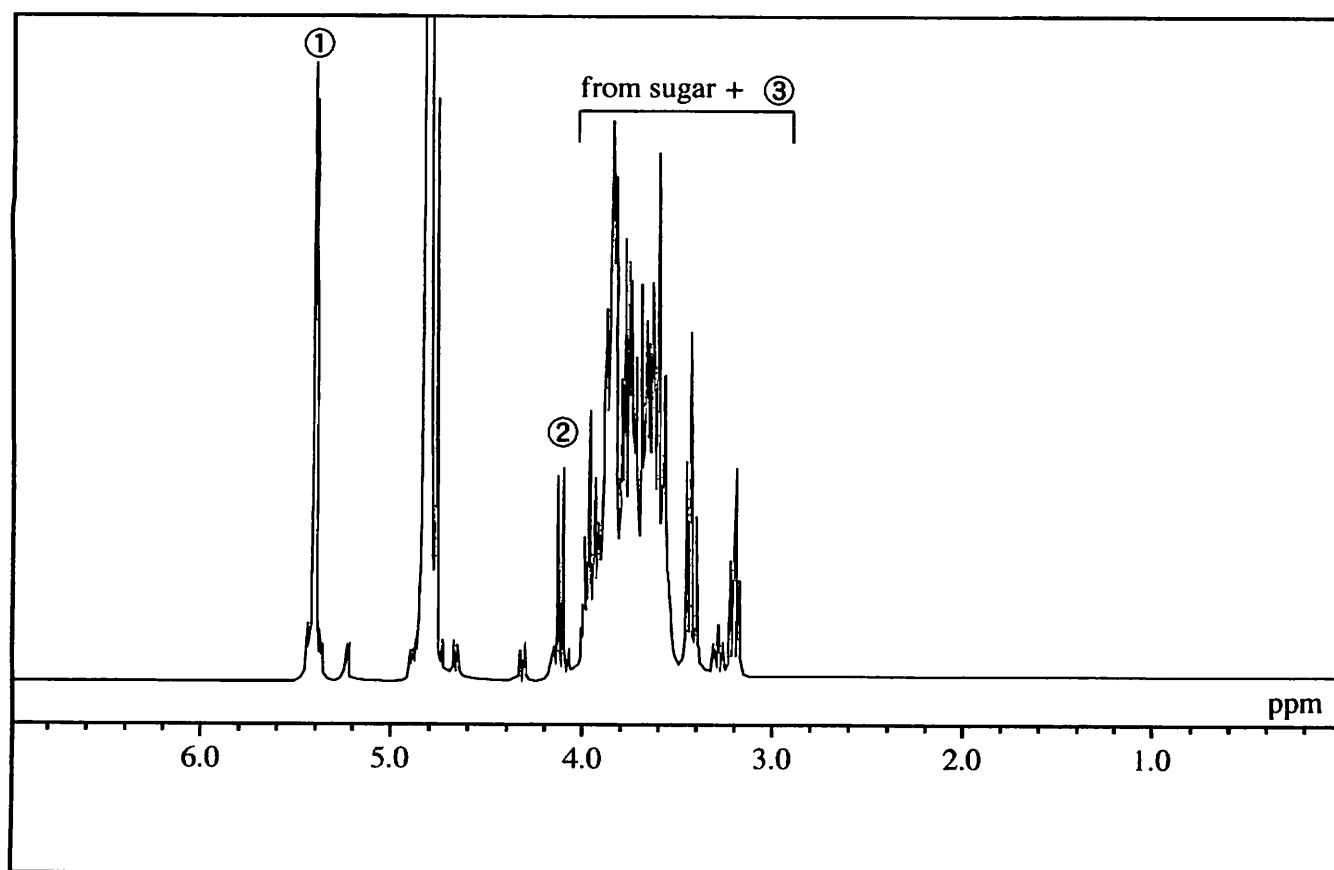


Figure2-38 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of 2-(methacryloyloxy)ethylureido maltotriose



	①	② + ③	+ from sugar
理論値	1.0		19.0
実測値	1.00		19.9

Figure 2-35 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of maltotriosylamine

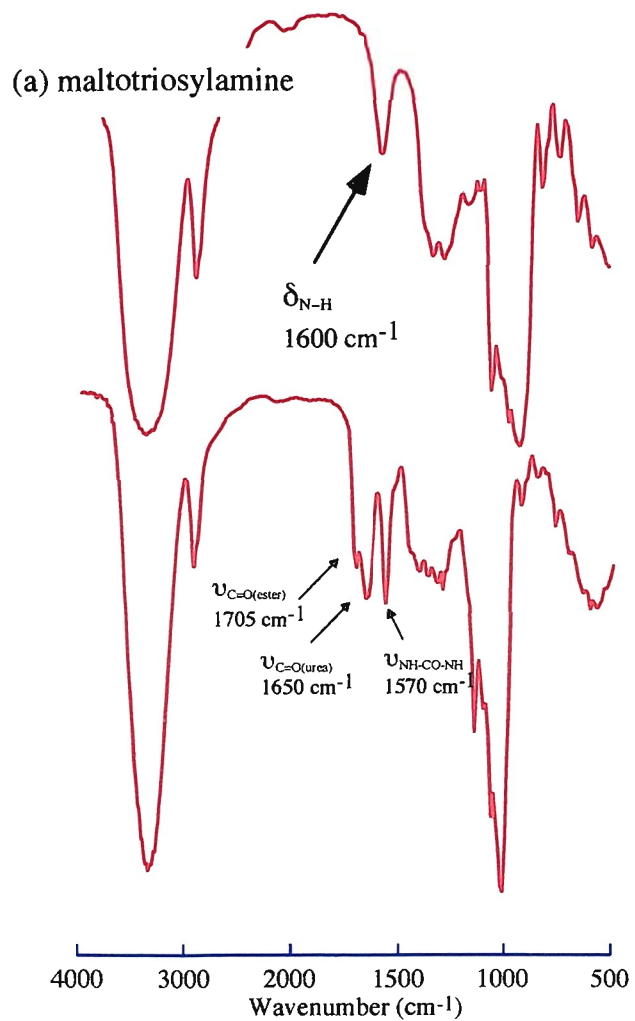


Figure 2-32 FT-IR spectra of (a) maltotriosylamine, (b) 2-(methacryloyloxy)ethylureido maltotriose

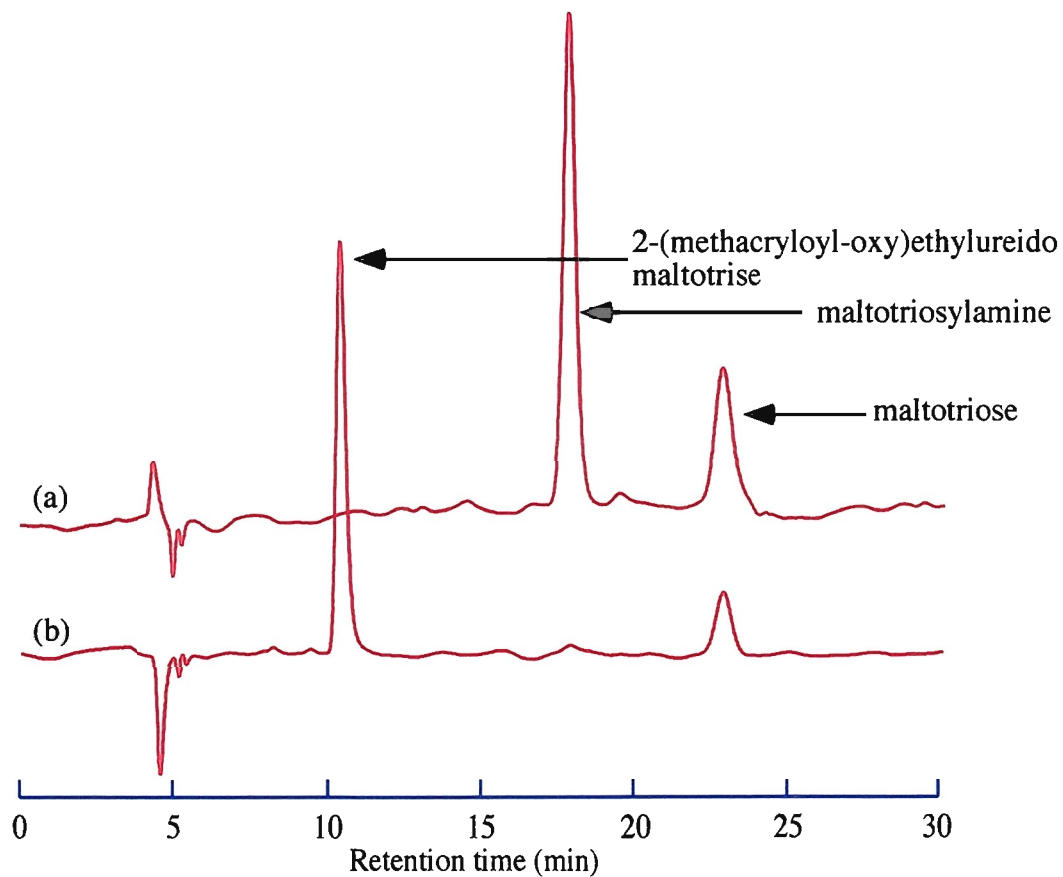
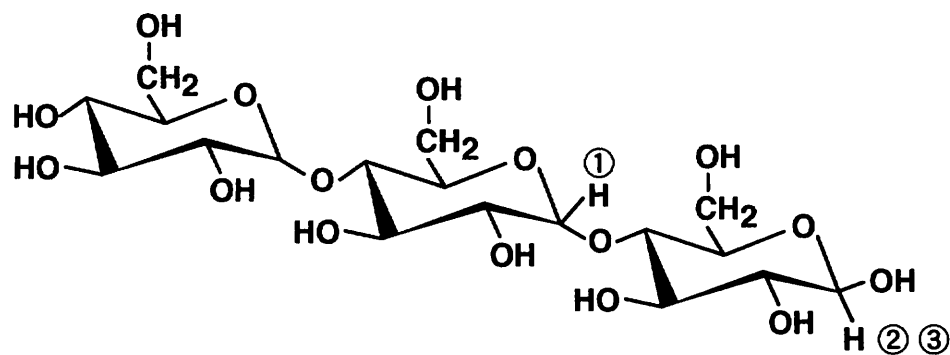
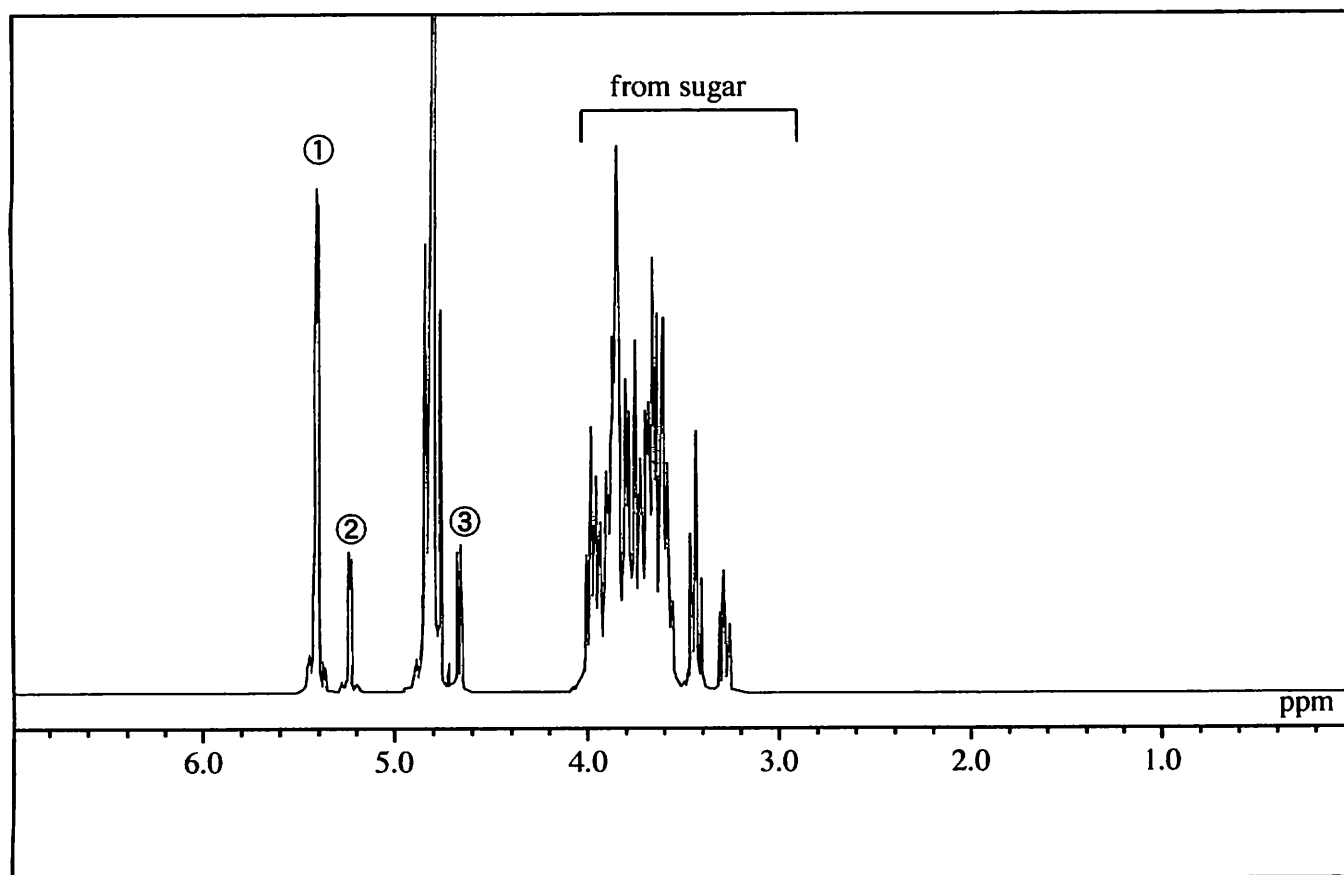


Figure 2-37 Chromatograms of (a) maltotriosylamine and (b) obtained 2-(methacryloyloxy)ethylureido maltotriose with Asahipak NH2P-50 (4.6 mm I.D. x 250 mm) at 20 °C. Mobile phase: Acetonitrile -water (7 : 3), flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.



	①	② + ③	from sugar
理論値	1.0	1.0	18.0
実測値	1.00	0.99	11.5

Figure 2-34 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of 2-(methacryloyloxy)ethylureido maltotriose

第三章

オリゴ糖マクロマーの単独重合と物性評価

3-1 はじめに

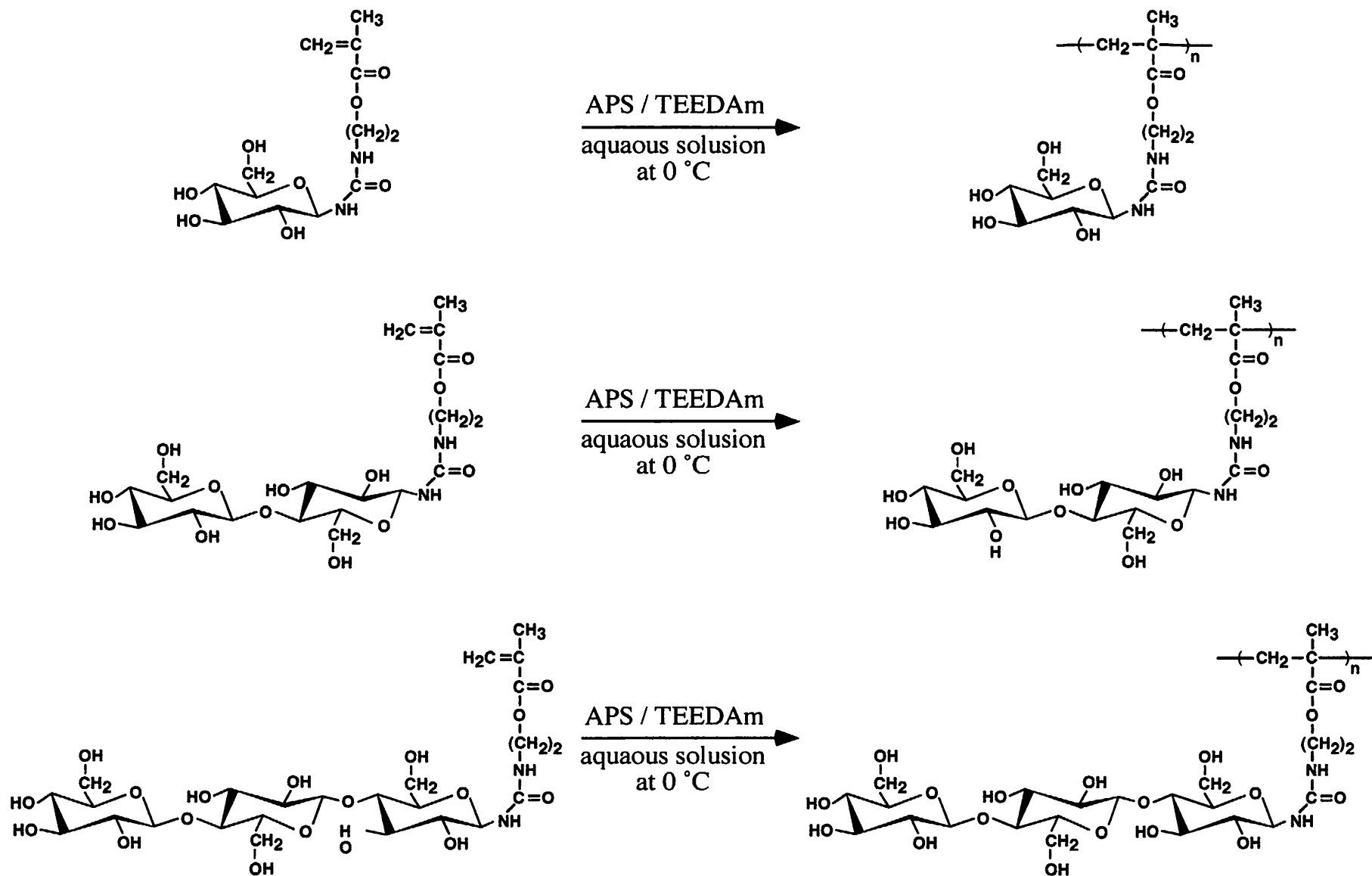
通常、ビニル基を有するモノマーをラジカル重合することによって、ポリマーを得ることができる。重合方法としては、溶液重合、バルク重合、乳化重合、懸濁重合、塊状重合などがあげられる。ここでは、溶液重合を採用し、第2章で得られた糖モノマーを重合しホモポリマーを得ることを目的とした。

一般に知られているように、ビニルモノマーのラジカル重合はFigure 3-1に示すような開始、成長、停止、連鎖移動の四つの素反応よりなる連鎖反応機構で進行する。ここで、I は開始剤、M はモノマー、T は連鎖移動剤、 $M_n \cdot$ は連鎖伝伝体である成長ラジカル、 $R \cdot$ は一次ラジカル、 $T \cdot$ は移動剤ラジカルを示す。ラジカル重合は熱、光あるいは放射線の作用で起こり、一般には開始剤あるいは光増感剤存在下で行われる。まず熱などの外部刺激によって、I が分解し、一次ラジカル $R \cdot$ を生成する。ここで生成した $R \cdot$ は比較的速やかにモノマーM に付加し、成長ラジカル $M_n \cdot$ を生成する。用いられる重合開始剤として、2,2-アゾビスイソブチロニトリル (AIBN)、アゾビスバレロニトリル、2,2-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩などの脂肪族アゾ化合物、過酸化ベンゾイル、過酸化ラウロイルなどの有機過酸化物などが挙げられる。また、過硫酸塩と第1鉄塩、過酸化ベンゾイル (BPO)とジメチルアニリン (DMA)など酸化-還元系を利用して低温で速やかに一次ラジカルを生成するレッドックス開始剤³⁸⁻³⁹⁾などを例示することができる。

本章で用いた主な試薬及び溶媒を Table 3-1 に示す。また、使用した分析機器を以下に示す。

Table 3-1 本章で用いた主な試薬及び溶媒

試薬名	会社名	カタログNo.
ペルオキシ二硫酸アンモニウム	和光純薬工業 (株)	018-03282
テトラメチルエチレンジアミン	関東化学 (株)	40762-41
重水	関東化学 (株)	13366-4M
臭化リチウム一水和物	和光純薬工業 (株)	125-01122
Spectra / Por 3	フナコシ (株)	FED-132720



Scheme 3-1 Polymerization of 2-(methacryloyloxy)ethylureido saccharides

【TEM】

JEOL JEM-2000FX Electron Microscope

【動的光散乱測定装置】

Malvern HPPS HPPS5001

FT-IR, HPLC, $^1\text{H-NMR}$ は 2-1 参照。

3-2 単独重合

第 2 章で得られた糖モノマーの単独重合を行った。重合スキームを Scheme3-1 に示す。重合開始剤は酸化-還元系を利用して低温で速やかに一次ラジカルを生成するレドックス開始剤を用いた。

3-2-1 2-(methacryloyloxy)ethylureido glucose の単独重合

2-(methacryloyloxy)ethylureido glucose 0.763 g (1.61 mmol) を、脱気水 5 ml に溶解させ、氷冷下で窒素通気を 30 分間行った。その後 *N,N,N',N'*-tetraethylethylenediamine (TEEDAm) を 27.8 mg (0.161 mmol) を加え、開始剤として ammonium persulfate (APS) 3.66 mg (0.0585 mmol) を添加し、氷冷下で窒素雰囲気下 3 時間かき混ぜた。その後、反応液を 2 倍に希釈し、3 日間透析により精製し、凍結乾燥を行い白色物を得た。

3-2-2 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose の単独重合

2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose 2.4 g (5.85 mmol) を、脱気水 10 ml に溶解させ、氷冷下で窒素通気を 30 分間行った。その後 *N,N,N',N'*-tetraethylethylenediamine (TEEDAm) を 100.8 mg (0.585 mmol) を加え、開始剤として ammonium persulfate (APS) を 13.35 mg (0.0585 mmol) を添加し、氷冷下で窒素雰囲気下 3 時間かき混ぜた。その後、反応液を 2 倍に希釈し、3 日間透析により精製し、凍結乾燥を行い、1.2 g の白色物を得た。収率 60 % であった。得られたポリマーの DSC 測定と昇温履歴の顕微鏡写真を Figure 3-3, Figure 3-4 に示す。

3-2-3 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellotriose の単独重合

2-(methacryloyloxy)ethylureido cellotriose 0.25 g (0.30 mmol) を、脱気水 5 ml に溶解させ、氷冷下で窒素通気を 30 分間行った。その後 *N,N,N',N'*-tetraethylethylenediamine (TEEDAm) を 5.17 mg (0.03 mmol) を加え、開始剤として ammonium persulfate (APS) を

0.68 mg (0.003 mmol)を添加し、氷冷下で窒素雰囲気下3時間かき混ぜた。その後、反応液を2倍に希釈し、3日間透析により精製し、凍結乾燥を行い、0.16 gの白色物を得た。収率63%であった。

3-2-4 2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose の単独重合

2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose 4.46 g (5.85 mmol)を、脱気水20 mlに溶解させ、氷冷下で窒素通気を30分間行った。その後 *N,N,N',N'*-tetraethylethylenediamine (TEEDAm) を100.8 mg (0.585 mmol)を加え、開始剤として ammonium persulfate (APS) を13.35 mg (0.0585 mmol)を添加し、氷冷下で窒素雰囲気下3時間かき混ぜた。その後、反応液を2倍に希釈し、3日間透析により精製し、凍結乾燥を行い、1.2 gの白色物を得た。収率60%であった。

3-2-5 2-(methacryloyloxy)ethylureido maltotriose の単独重合

2-(methacryloyloxy)ethylureido maltotriose 1.0 g (1.24 mmol)を、脱気水5 mlに溶解させ、氷冷下で窒素通気を30分間行った。その後 *N,N,N',N'*-tetraethylethylenediamine (TEEDAm) を21.3 mg (0.124 mmol)を加え、開始剤として ammonium persulfate (APS) を2.83 mg (0.0124 mmol)を添加し、氷冷下で窒素雰囲気下3時間かき混ぜた。その後、反応液を2倍に希釈し、3日間透析により精製し、凍結乾燥を行い、0.52 gの白色物を得た。収率63.4%であった。

3-2-6 FT-IR 及び ¹H-NMR スペクトル測定

得られたポリマーのFT-IRスペクトル測定を行った結果、モノマーのスペクトルに比べ顕著にブロードニングが確認された。これはポリマー化に伴うポリマー側鎖の自由度の低下に起因していると考えられる。¹H-NMRスペクトル測定で、ポリマー化に伴うピークのブロードニングが確認できる。さらに5.6~5.9 ppm付近のビニル基(=CH₂)に由来するピークが消失し、メチレン基に由来する新たなピークが1.5 ppm付近に出現していることから、重合反応が進行したと考えられる。

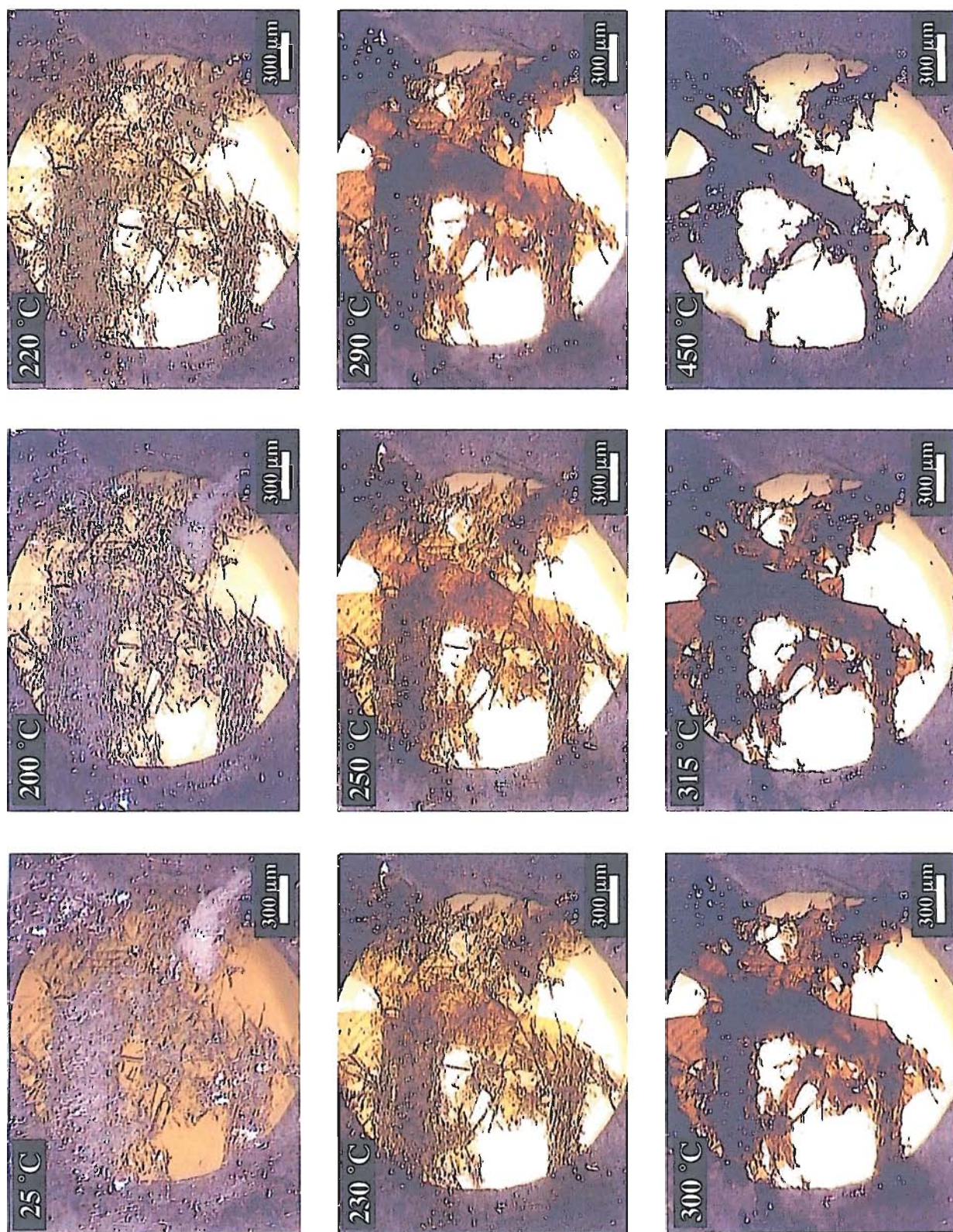


Figure 3-4 Optical micrographs of thermhistory (25 ~ 450 °C) for poly 2-(methacryloyloxy) ethylureido cellobiose.

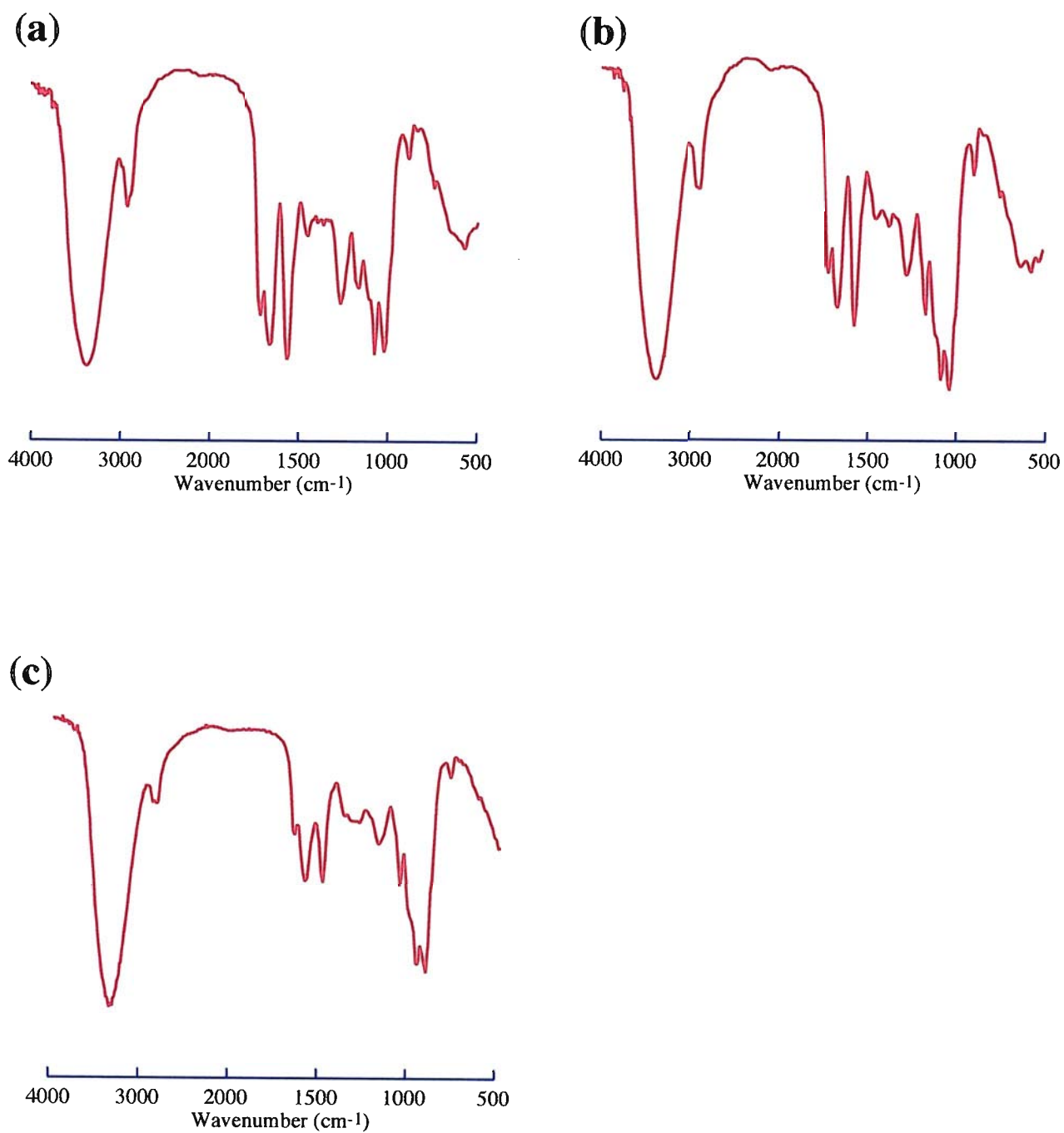
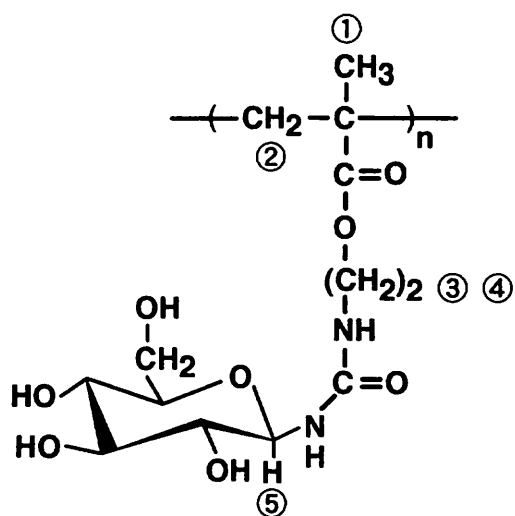
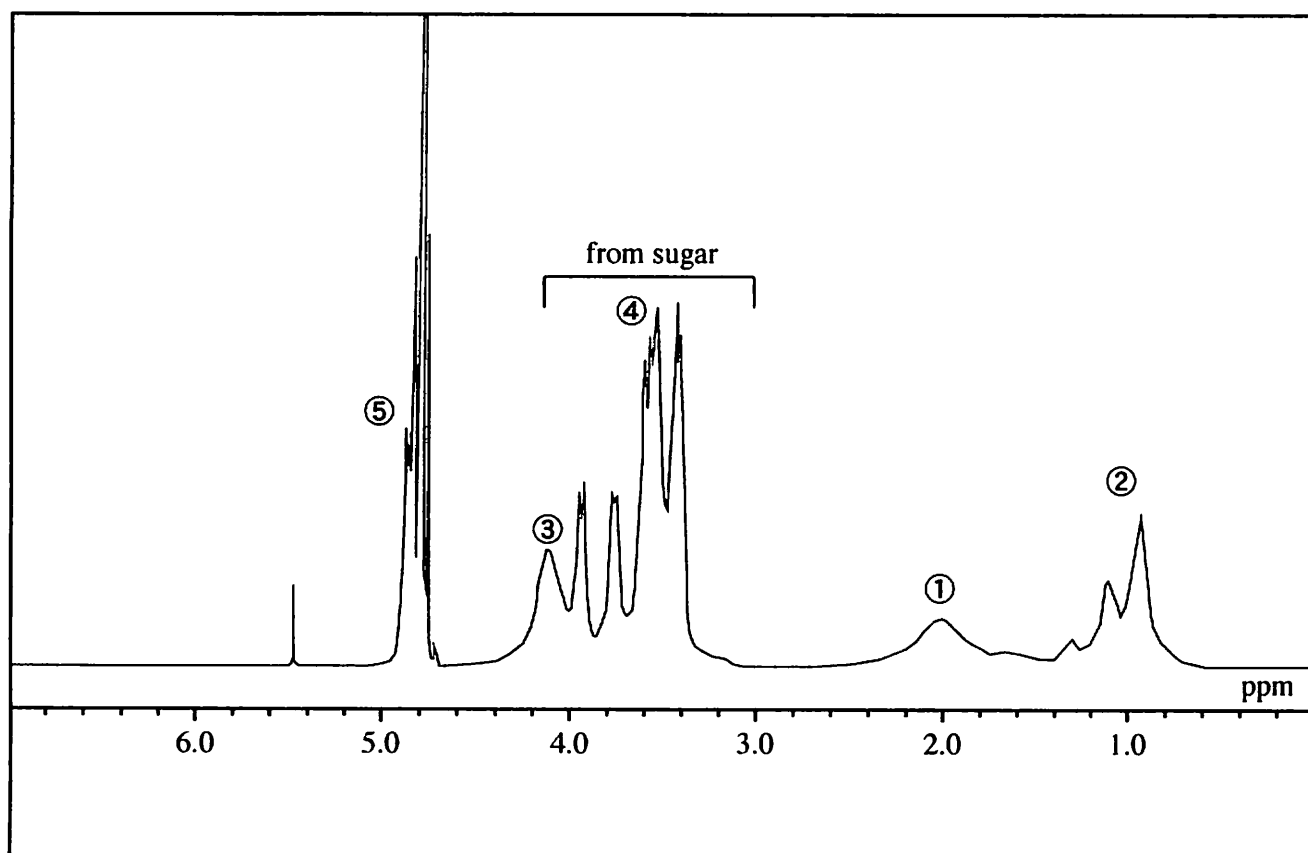


Figure 3-2 FT-IR spectra of (a) poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido glucose), (b) poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose) and (c) poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido cellotriose)



	①	②	③ + ④	+ from sugar	⑤
理論値	3.0	2.0	10.0		1.0
実測値	3.20	1.02	1.03		-

Figure 3-6 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido glucose)

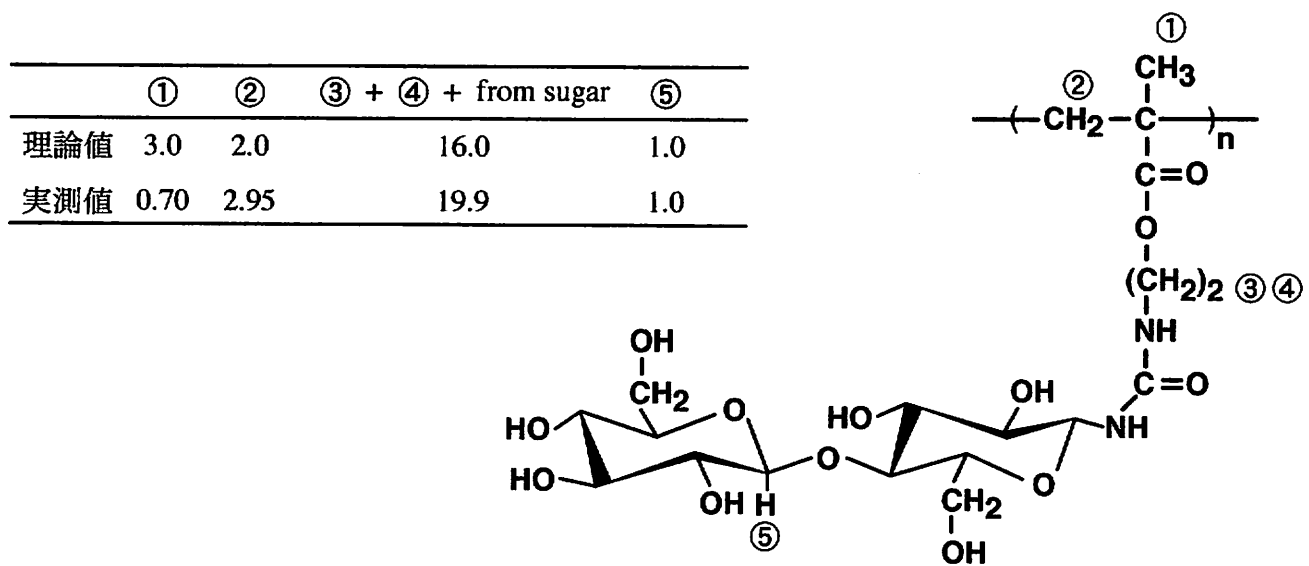
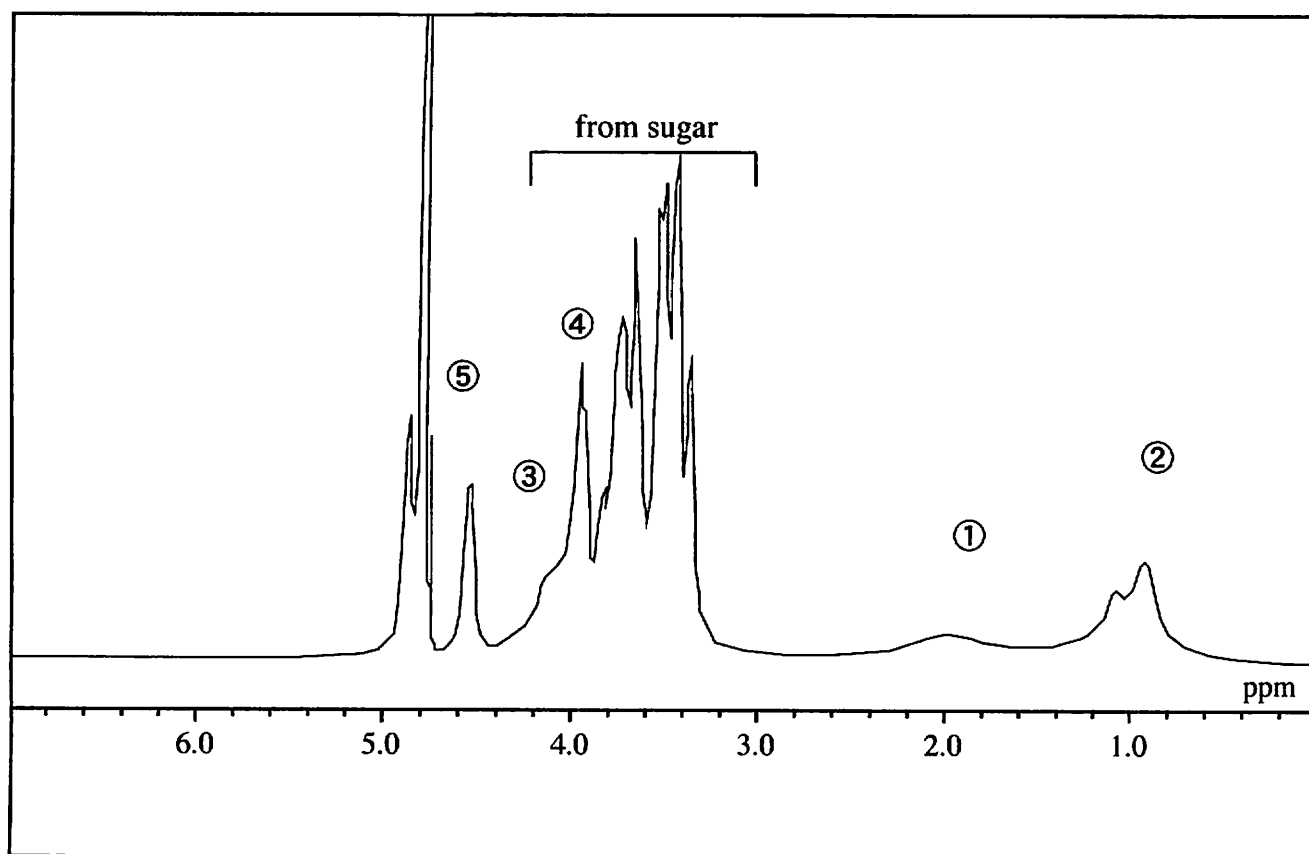


Figure 3-7 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose)

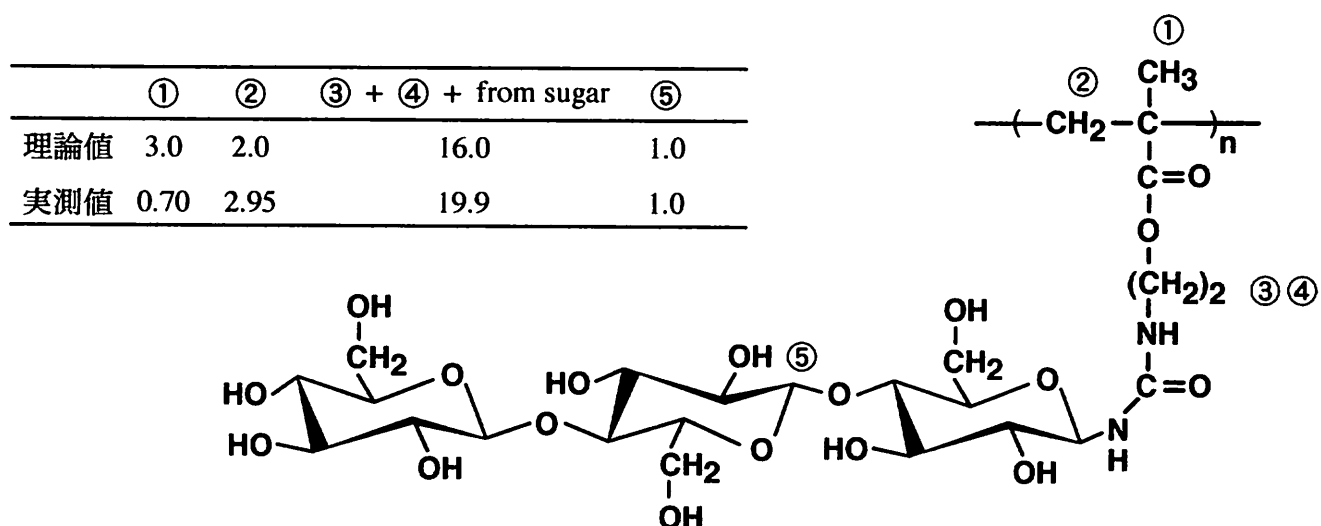
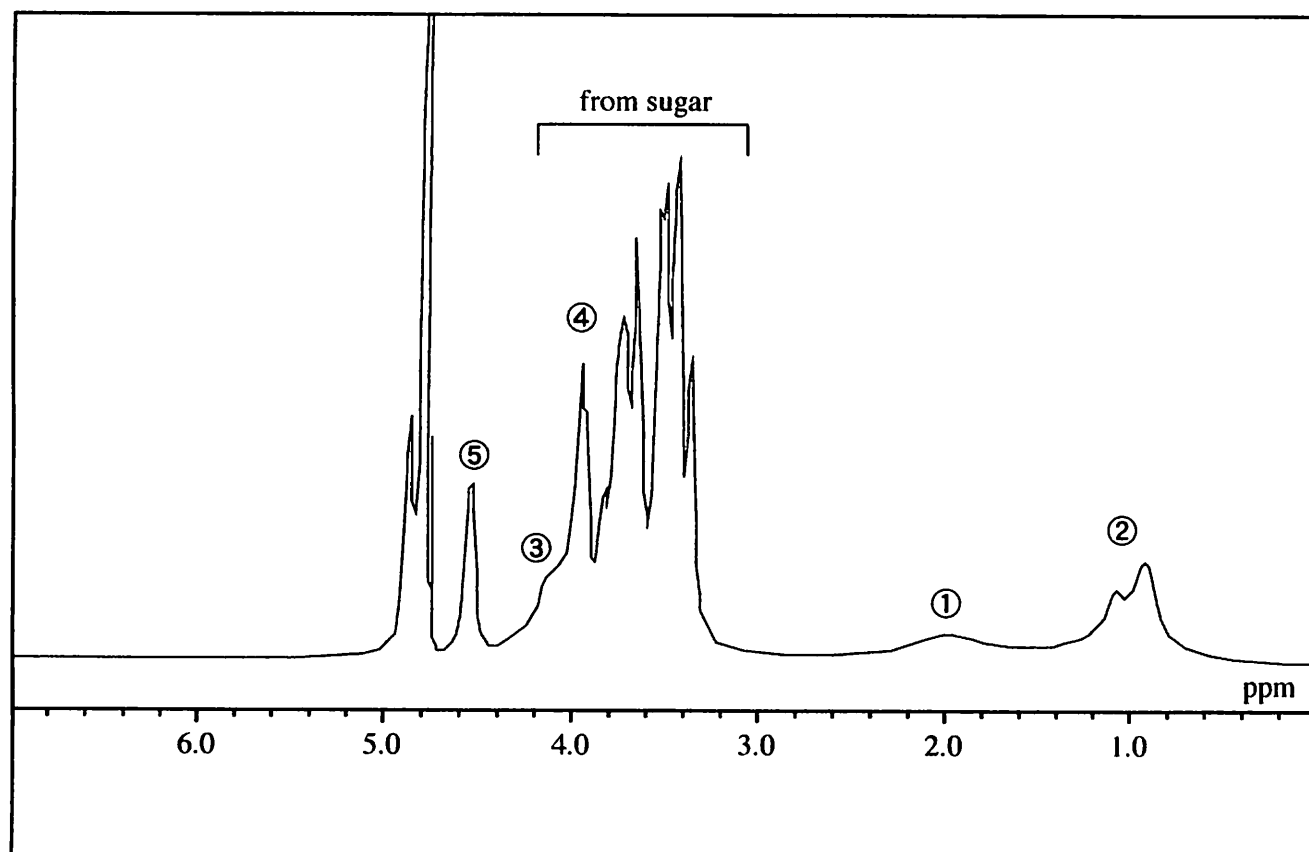


Figure 3-8 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido cellotriose)

3-3 分子量・分子量分布測定

高分子は単一の分子量のものではなく、様々な分子量をもつ高分子の混合物である。分子量が大きくなると、その溶解性が小さくことを利用し高分子を大まかに分離することが可能である。分離した各フラクションの重量と平均分子量から分子量分布曲線を作成することができる。分子量分布曲線がシャープになるほど、その高分子は単分散であるといえる。天然高分子やニトロセルロースなどの半合成高分子は、単分散性高分子に近いものが多い。近年、合成高分子分野においてもリビング重合などの手法をもちいて単分散高分子の合成が報告されている⁴⁰⁻⁴³⁾が、通常のラジカル重合により得られた合成高分子はブロードな分布をもつ多分散性高分子である。このように高分子は多分散性であるため、平均の分子量しか求めることはできない。さらに分子量の測定方法によっても平均のとりかたが異なり、平均分子量の値も異なってくる。例えば、分子量が M_i の高分子が N_i 個存在する (i は $1 \sim \infty$) と仮定する。この場合の平均分子量は次の式のように示される。

粘度平均分子量における α は極限粘度 ($[\eta]$) と分子量の間に $[\eta] = KM^\alpha$ の関係が成り立つ。一般に α はビニル系高分子では $0.5 \sim 1.0$ の値を示す。分子量 100 の高分子が 10 分子と分子量 1000 の高分子が 5 分子の混合物があると仮定すると、 $M_n = 400$,

$M_w = 850$, $M_v = 811$, $M_z = 982$ となる ($\alpha =$

0.6)。通常多分散性高分子では、これらの

計算結果の様に $M_n < M_v < M_w < M_z$ となる。

もちろん単分散性高分子の場合は

$M_n = M_v = M_w = M_z$ であるので M_w/M_n を多分

散度の尺度として用いる。異なる分子量測

定方法で求めた平均分子量がどのような

平均値かを留意しなければ比較すること

はできない。Table 3-2 に分子量測定法と平

均分子量の関係をまとめた。

数平均分子量

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

重量平均分子量

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

粘度平均分子量

$$M_v = \frac{(\sum N_i M_i^{\alpha+1})^{1/\alpha}}{(\sum N_i M_i)^{1/\alpha}}$$

Z平均分子量

$$M_z = \frac{\sum N_i M_i^3}{\sum N_i M_i^2}$$

3-3-1 サイズ排除クロマトグラフィー (size exclusion chromatography (SEC))

Table 3-2 Details of average molecular weight and measurement techniques

平均分子量	分子量測定法
数平均分子量	末端定量法, 浸透圧法, 沸点上昇法
重量平均分子量	光散乱法
粘度又は重量平均分子量	粘度法, 超遠心法
Z又は重量平均分子量	超遠心法

サイズ排除クロマトグラフィーは、試料の大きさの順に充填剤の細孔から排除されていくことを利用する分離法である。分子量を求めるにはまず分子量既知の標準試料をいくつか測定し、較正曲線を求めなければならない。これから、各分子量 (M_w : molecular weight) に対応するピークの頂点の時間 (溶出時間=ET: Elution Time) を求め、縦軸に分子量を対数でとり横軸には時間をとってプロットし、これらの点をつなぎあわせた線が較正曲線となる。次に、分子量・分子量分布を求めようとする高分子の測定を行い、既存の検量線と比較し分子量を推定する。SECは、溶離液として水溶液を用いる場合と、有機溶媒を用いる場合とに分類される。有機溶媒を用いる場合を、GPCと言う。HPLCが著しい発展を遂げた現在においても、疎水性高分子やオリゴマーの分子量に関する分析方法として大変有用な手法といえる。水溶液を用いる場合を、GFCという。また、水系GPCという言い方をすることもある³¹⁾。

3-3-2 SEC較正曲線の作成

標準試料にShodex STANDARD P-82を用いSEC較正曲線を作成した。Figure3-10に標準試料の化学構造を、Table 3-3にその詳細を示す。測定条件は以下の通り。

Column name: OHpak SB-806M HQ (8.0 mm I.D. x 300 mm)

Eluent: water, 10 mM LiBr aq., Flow rate: 0.5 ml/min, Detector: RI, Temperature: 20 °C

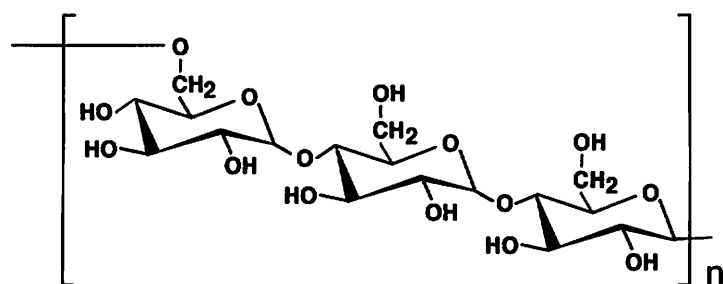


Figure 3-10 Chemical structure of pullulan standard

各分子量の標準試料より1.0 mg / mlの水溶液を調製し、これを測定サンプルとした。溶離液には、高分子の分子間・分子内水素結合を阻害するLiBrを添加した水溶液と超純水の2種類を用いた。得られた分析結果をTable 3-4に示す。

さらに較正曲線をFigure 3-11に示す。今回標準試料に用いたpullulanは純水中や塩水溶液で安定であり変質が起こりにくく、分子間で特異な相互作用を起こさないと報告されている^{44,45)}。Table 3-4, Figure 3-11の結果より、分子間・分子内水素結合を阻害するLiBrを添加した系でも超純水での系と溶出時間に大差がないことから、pullulanは今回の2つの条件下では安定な分子状態を保っていると考えられる。

Table 3-3 Molecular weight distribution of pullulan

Grade	M_w	M_w / M_n
P-800	78.8×10^4	1.23
P-400	40.4×10^4	1.13
P-200	21.2×10^4	1.13
P-100	11.2×10^4	1.12
P-050	4.73×10^4	1.06
P-020	2.28×10^4	1.07
P-010	1.18×10^4	1.10
P-005	0.59×10^4	1.09

Table 3-4 Elution time of standard sample

Grade	Elution time (min)	
	H ₂ O	10 mM LiBr aq
P-800	15.04	15.35
P-400	15.64	15.98
P-200	16.53	16.66
P-100	17.15	17.32
P-050	17.90	18.03
P-020	18.49	18.59
P-010	18.91	19.11
P-005	19.34	19.43

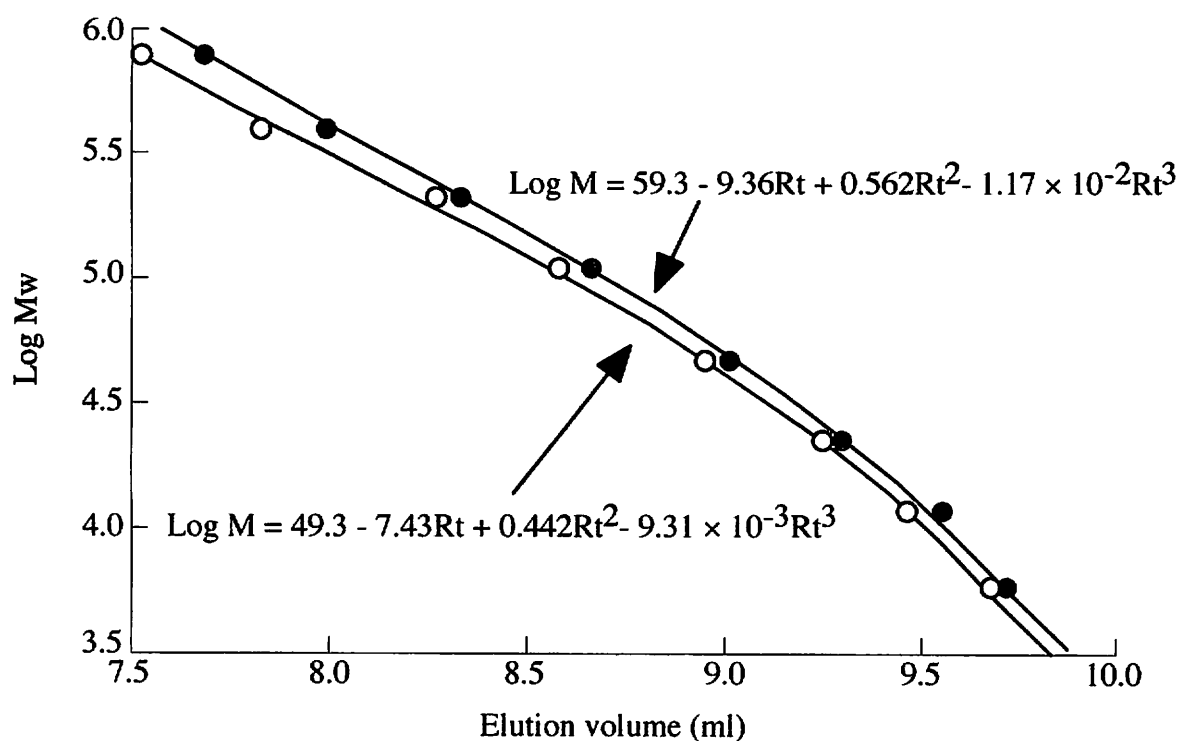


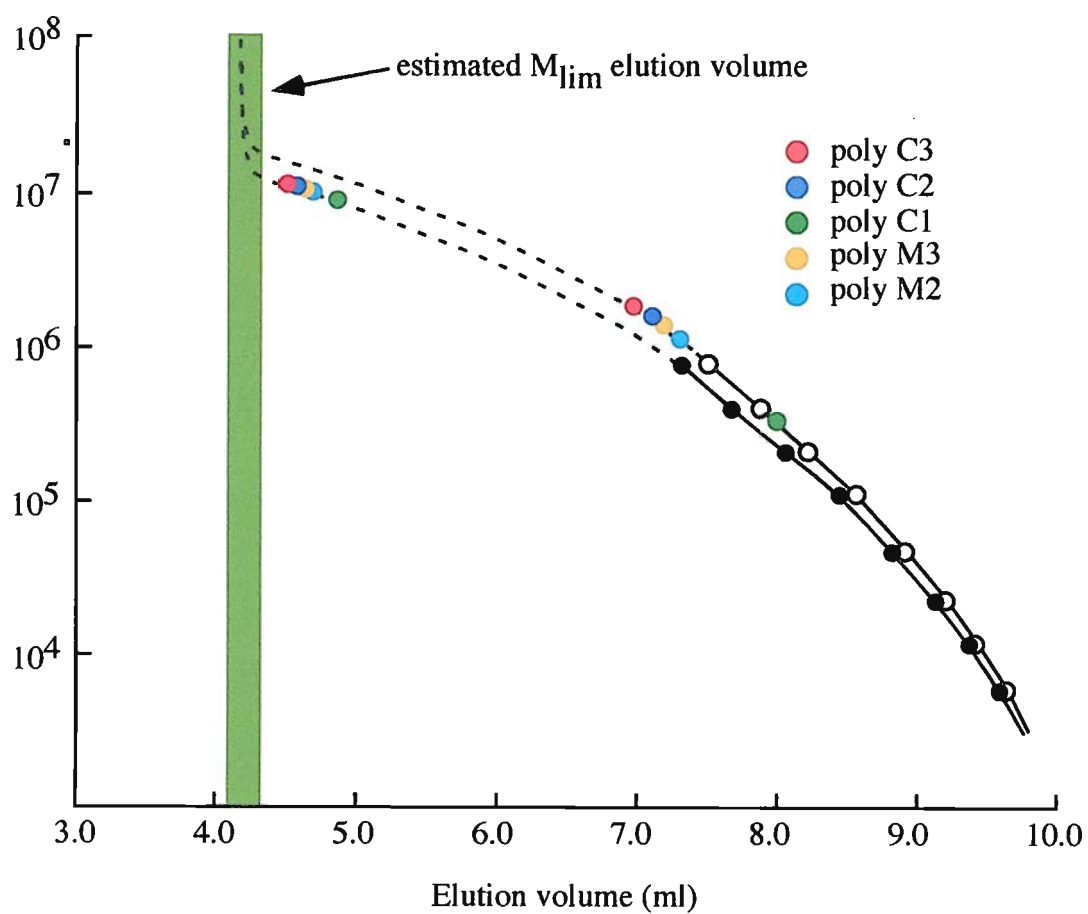
Figure 3-11 SEC calibration curves for pullulan standard with Shodex OHpak SB-806M HQ (8.0 mm I.D. x 300 mm) at 20 °C. Eluent: water (○) and 10mM LiBr aq (●), flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.

3-3-3 SEC分析

先に得られた3種類のポリマーと、lactose, maltose, maltotrioseから第2章及び第3章と同様に合成したポリマー（付記2参照）の6種類のSEC分析を行った。それぞれのポリマーより1.0 mg/mlの水溶液を調製し、これを測定サンプルとした。溶離液には、較正曲線作成時と同様に高分子の分子間・分子内水素結合を阻害するLiBrを添加した水溶液と超純水の2種類を用いた。Figure 3-12 ~ Figure 3-18にそれぞれのポリマーのクロマトグラムを示す。またTable 3-5, Figure 3-19にSEC分析により算出された M_w , M_n を示した。溶出液に超純水を用いた場合、今回測定に用いたSECカラム（OHpak SB-806M HQ）の排除限界体積付近での溶出が確認され、プルラン換算で数千万の分子量（Shodexカタログ発表値）に相当する巨大な集合体の形成が示唆された。これは側鎖の糖の水素結合に起因すると考えられる。そこで、水素結合を阻害する塩を添加し測定を行ったところ、Figure 3-12 ~ Figure 3-18にそれぞれ示すように溶出時間に遅れが確認され、さらにピークにブロードニング現象が見られた。これは、分子間水素結合により会合した高分子側鎖が、LiBrを溶離液に添加することにより、水素結合が切断され、会合が抑制され、分子の広がりが減少したとためと考えられる。

Table 3-4 Elution volume, molecular weight and distribution of obtained poly (oligosaccharide)s and poly (acrylamide)

Component sample	Elution volume (ml)		$M_w \times 10^{-3}$	M_w / M_n
	H ₂ O	10 mM LiBr aq		
glucose	4.835	8.080	78.5	6.71
lactose	4.634	7.450	261.3	11.7
maltose	4.625	7.440	272.8	7.06
cellobiose	4.546	7.245	329.9	9.70
maltotriose	4.600	7,260	305.8	5.84
cellotriose	4.491	7.150	387.4	5.73
acrylamide	4.962	8.150	45.9	2.79



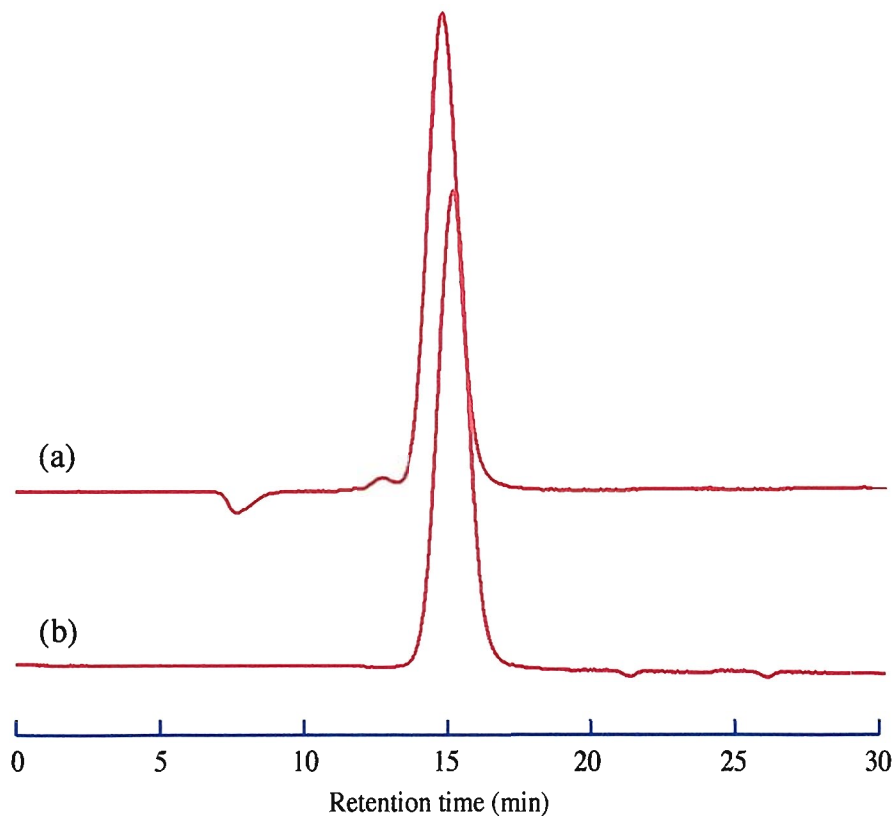


Figure 3-12 SEC chromatograms of pullulan standard (M_w = 7,800,000) with OHPak SB-806M HQ (8.0 mm I.D. x 300 mm) at 20 °C. Eluent: (a) water, (b) 10 mM LiBr aq., flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.

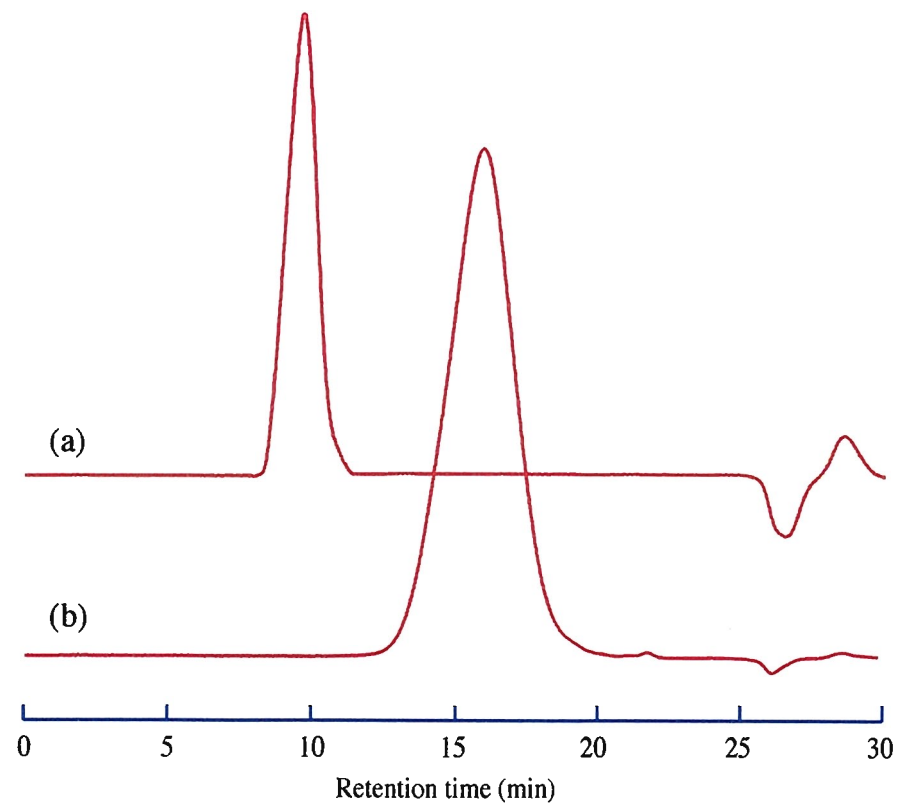


Figure 3-13 SEC chromatograms of poly 2-(methacryloyloxy)ethylureido glucose with OHPak SB-806M HQ (8.0 mm I.D. x 300 mm) at 20 °C. Eluent: (a) water, (b) 10 mM LiBr aq., flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.

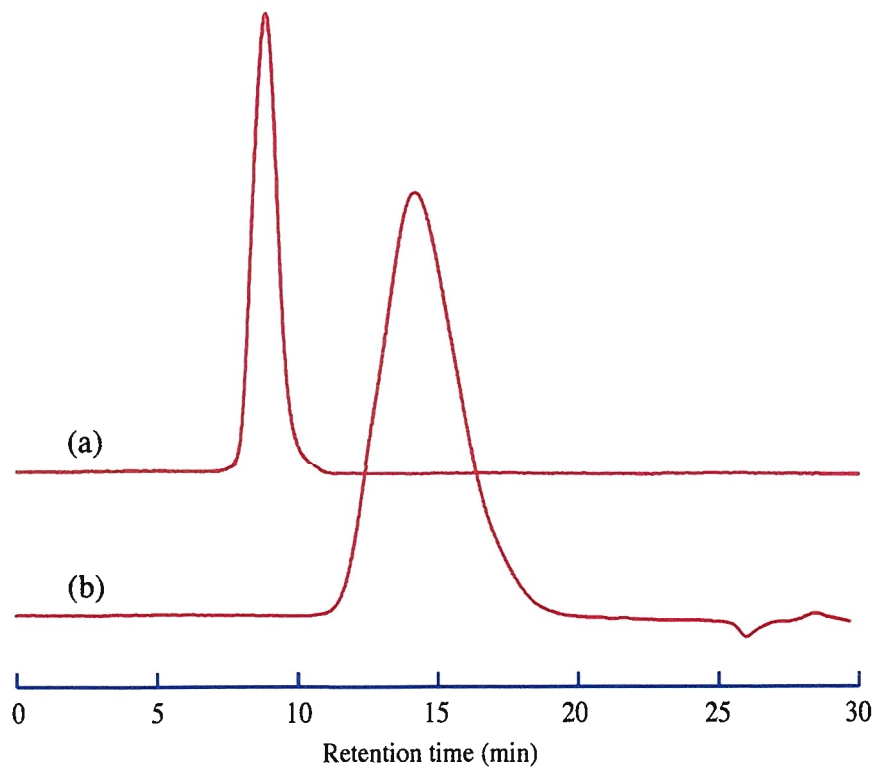


Figure 3-14 SEC chromatograms of poly 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose with OHPak SB-806M HQ (8.0 mm I.D. x 300 mm) at 20 °C. Eluent: (a) water, (b) 10 mM LiBr aq., flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.

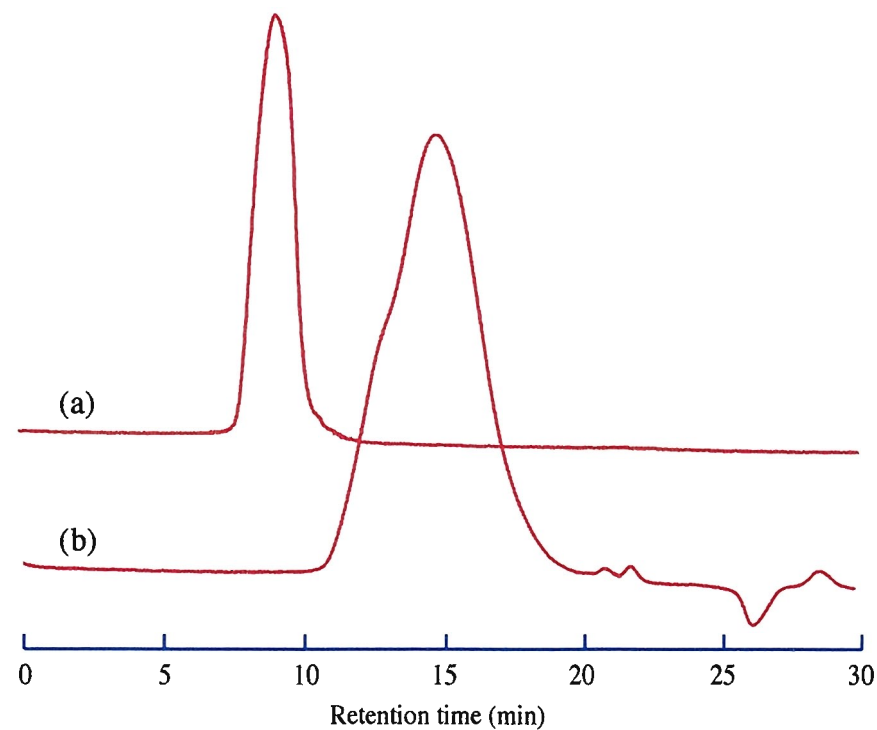


Figure 3-15 SEC chromatograms of poly 2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose with OHPak SB-806M HQ (8.0 mm I.D. x 300 mm) at 20 °C. Eluent: (a) water, (b) 10 mM LiBr aq., flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.

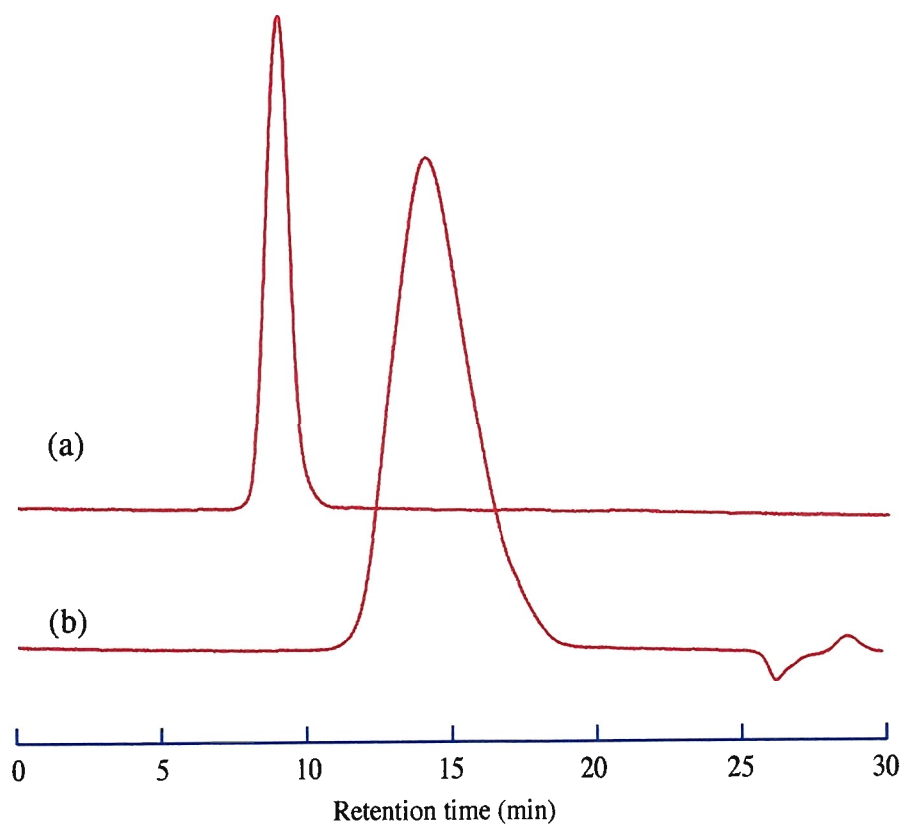


Figure 3-16 SEC chromatograms of poly 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellotriose with OHPak SB-806M HQ (8.0 mm I.D. x 300 mm) at 20 °C. Eluent: (a) water, (b) 10 mM LiBr aq., flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.

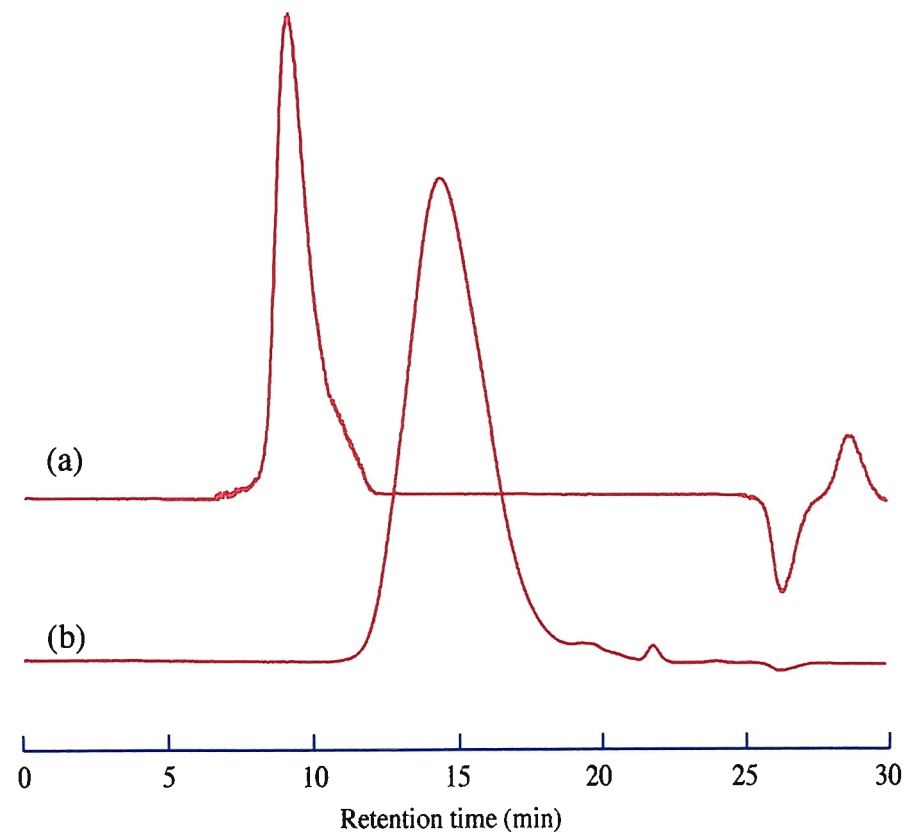
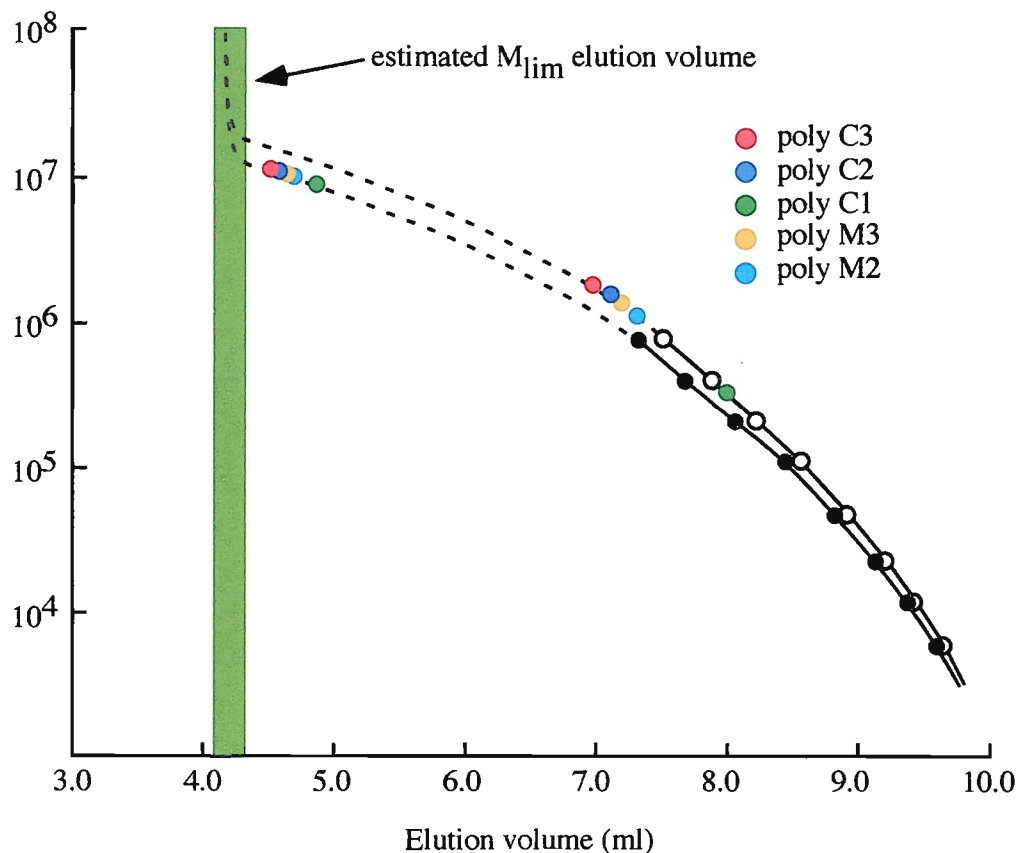
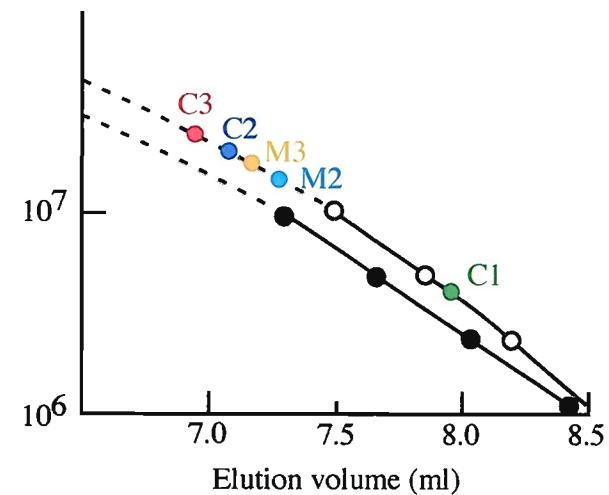


Figure 3-17 SEC chromatograms of poly 2-(methacryloyloxy)ethylureido maltotriose with OHPak SB-806M HQ (8.0 mm I.D. x 300 mm) at 20 °C. Eluent: (a) water, (b) 10 mM LiBr aq., flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.



SEC calibration curves for pullulan standard with Shodex OHpak SB-806M HQ (8.0 mm I.D. x 300 mm) at 20 °C. Eluent: water (●) and 10 mM LiBr aqueous solution (○), flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.



Component sample	Elution volume (ml)		$M_w \times 10^{-5}$
	H ₂ O	10 mM LiBr aq	
C1 (glucose)	4.835	8.080	78.5
C2 (cellobiose)	4.546	7.245	329.9
C3 (cellotriose)	4.491	7.150	387.4
M2 (maltose)	4.625	7.440	272.8
M3 (maltotriose)	4.600	7,260	305.8

3-4 分子サイズ測定

近年、光散乱測定技術をコアとして、粒子のブラウン運動による散乱光の揺らぎを測定する動的散乱法による粒径測定装置や、粒子を電気泳動したときの散乱光のドップラー効果を測定する電気泳動光散乱法によるゼータ電位測定装置が開発され、溶液中の微粒子の分散状態に関する情報を得ることが可能となった。動的散乱法では、サブミクロン域以下 (Ar 光源: 1.4 nm ~ 5 μm、He-Ne, 光源: 3 nm ~ 5 μm) の粒径・粒径分布の測定が可能である。また、溶液中に分散している粒子の粒径・粒径分布測定が可能であることから、測定対象としては、無機系粒子、有機系粒子の分散系のみならず生体高分子や電解質高分子等の溶液系と幅広い粒子 (コロイド) の測定がおこなえ、かつ、粒子の凝集過程等のダイナミックな変化状態の情報を提供することができる。光散乱法による粒径測定範囲を Figure 3-20 に示す。

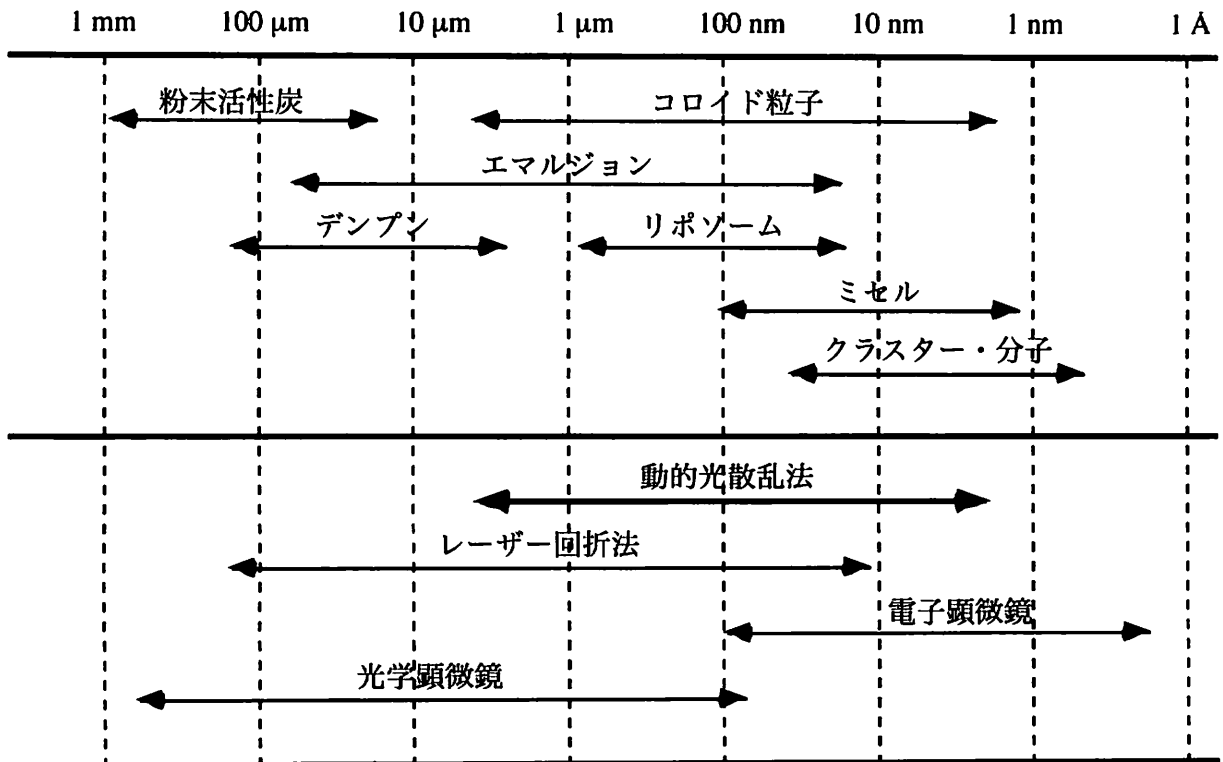


Figure 3-20 Particle sizing range and measuring devices

この範囲にある粒子は、溶液中で並進・回転等のブラウン運動 (Brownian motion) により、その位置、方位、形態を時々刻々変えている。これらの粒子にレーザー光を照射し、出てくる散乱光を検出すると、その粒子のブラウン運動に依存した散乱強度の揺らぎを観測することができる。このため、散乱光の時間的な揺らぎを観測すること

で、粒子のブラウン運動の速度（拡散係数）が得られ、さらには粒子の大きさを知ることが可能である。

3-4-1 動的光散乱法による粒径測定

Malvern HPPS HPPS5001 を用いて粒径測定を行った。先に得られた glucose, cellobiose, maltose, lactose を用いたポリマーと poly (acrylamide) をもちいて分析を行った。それぞれのポリマーより 1.0 mg / ml の水溶液, 1.0 mg / ml の 10 mM LiBr 水溶液を調製し, さらに 0.20 μm の ADVANTEC 製ディスクフィルター（親水性 PTFE 基質, 13HP020AN）を用いてそれぞれをろ過し, これを測定サンプルとした。得られた結果 Figure 3-21 ~ Figure 3-26, Table 3-6 に示す。測定溶媒に 10 mM LiBr 水溶液を用いた場合, サイズ分布曲線のピークトップは測定溶媒に蒸留水を用いた場合に比べて, 5 ~ 10 nm 増大し, さらに分布幅の減少がみられた。この現象は, すべてのオリゴ糖マクロポリマーにおいて確認された。

また, Beckman Coulter, Inc. N4 PLUS (サブミクロン粒子アナライザー) を用いて poly 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose の粒径測定を行った。サンプル調製は同様に行った。測定結果を Figure 3-27, Figure 3-28 に示す。Malvern HPPS HPPS5001.での測定結果同様, 測定溶媒に 10 mM LiBr 水溶液を用いた場合, サイズ分布曲線のピークトップは測定溶媒に蒸留水を用いた場合に比べて, 約 10 nm 増大し, さらに分布幅の減少みられた。これらの結果より, ポリマー溶液に LiBr を添加することにより, そのサイズ分布は減少し, 平均サイズは増加することが確認された。しかしながら, 水溶液中で測定を行った結果からは 300 ~ 500 nm の大きさを有する分子が存在することも明らかになった。

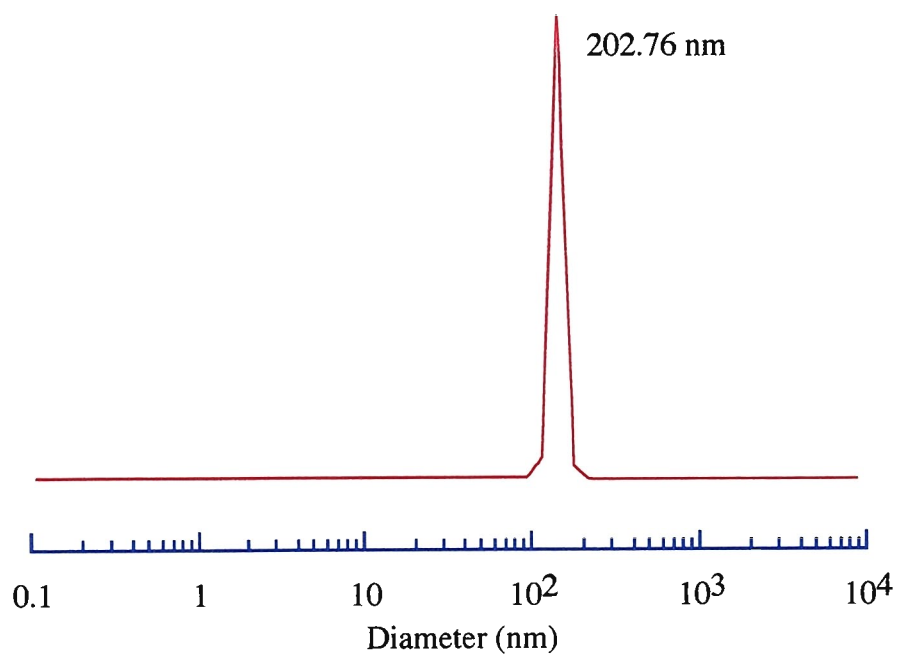


Figure 3-21 HPPS size distribution curve of standard sample (200 nm) at 20 °C. Solvent : water

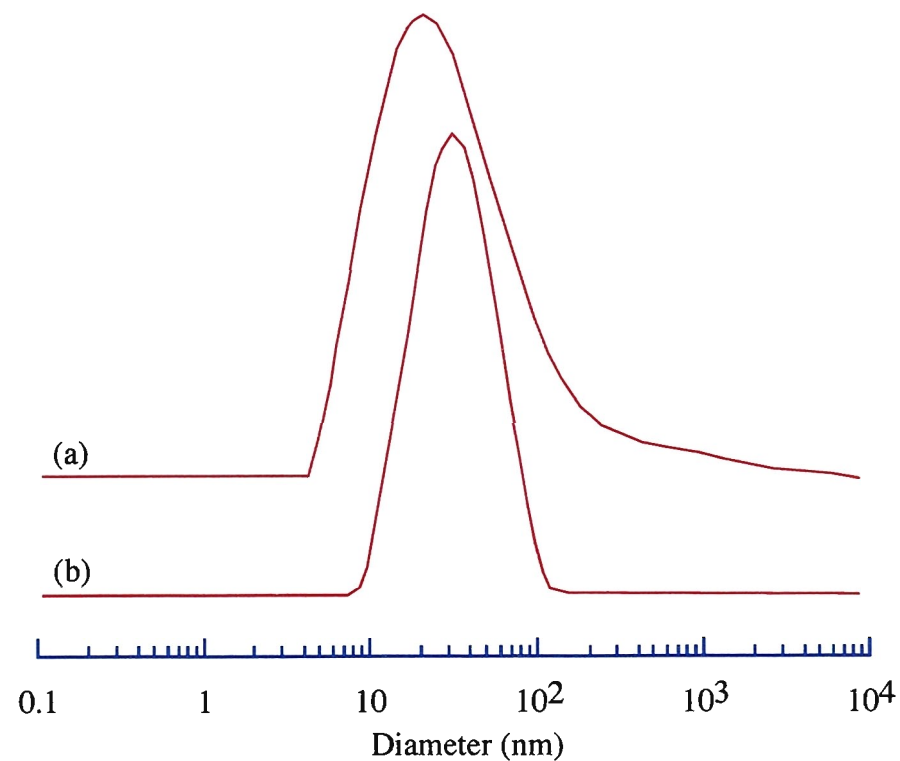


Figure 3-22 HPPS size distribution curve of poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido glucose) at 20 °C. Solvent : (a) water, (b) 10 mM LiBr aqueous solution.

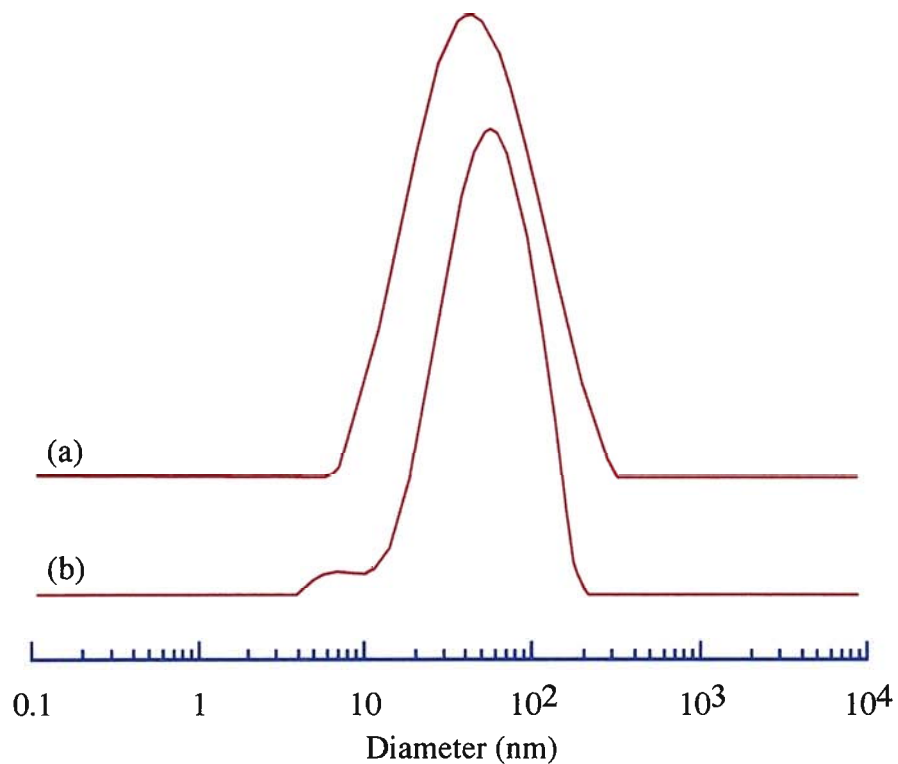


Figure 3-23 HPPS size distribution curve of poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose) at 20 °C. Solvent : (a) water, (b) 10 mM LiBr aqueous solution.

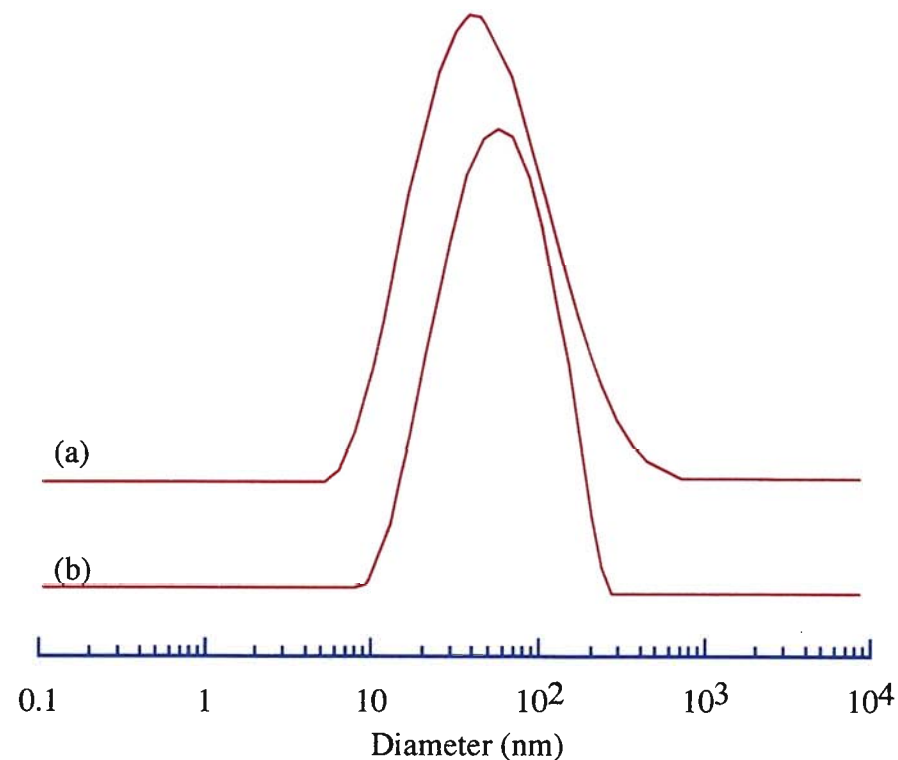


Figure 3-24 HPPS size distribution curve of poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose) at 20 °C. Solvent : (a) water, (b) 10 mM LiBr aqueous solution.

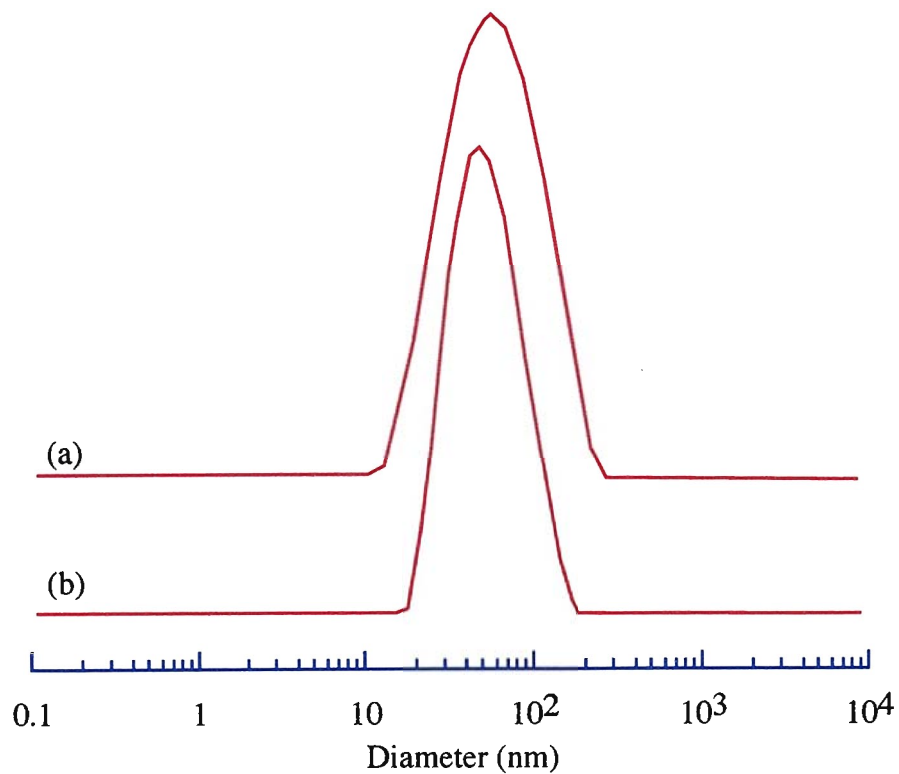


Figure 3-25 HPPS size distribution curve of poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido lactose) at 20 °C. Solvent : (a) water, (b) 10 mM LiBr aqueous solution.

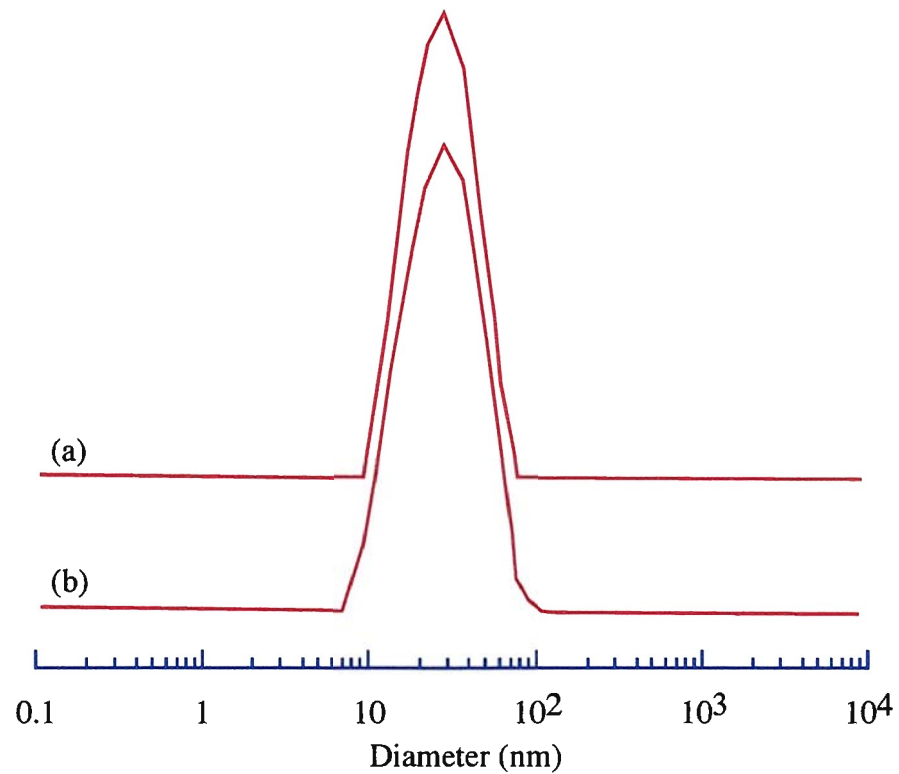


Figure 3-26 HPPS size distribution curve of poly(acrylamide) at 20 °C. Solvent : (a) water, (b) 10 mM LiBr aqueous solution.

3-5 ポリマーの生理活性評価

レクチンとは、糖鎖を特異的に認識して結合、架橋形成するタンパク質の総称で、その結合特異性により多様な種類に分類されている。その中でも、植物マメ科レクチンは、植物レクチンの中で最も大きなレクチンファミリーを形成し、70種類以上のものが知られている。分子量3万のサブユニットの2量体または4量体から成り、サブユニットあたり約270のアミノ酸から構成され、一次構造はマメ科レクチン間でN末端からC末端に至るまで一様に類似し、アミノ酸レベルで40%前後の相同性を持つ。糖結合部位はサブユニットごとに一つ存在し、2~3糖を同時に認識することができる大きさで、糖の結合には、カルシウムやマンガンなどの金属イオンが必須である。また、糖結合部位は、2つのループで糖鎖を挟み込む構造になっており、その奥のベータシート上の Asp, Glu, Asn, Gln, Arg, Lys などのアミノ酸の側鎖と、糖鎖の水酸基との間に水素結合が形成されることにより結合する。また、二つのループのうち1つは、カルシウム、マンガンを配位する金属結合部位の一部であり、これらの金属イオンが糖結合部位を構成する一つのループの構造を固定し、かつ糖との結合力を強めている^{8~13}。このマメ科レクチンの中でも、今回用いた Concanavalin A (Con A) は、 α -グルコース残基を選択的に結合するレクチンであり、糖の3位と4位の水酸基と、Asn, Gluの側鎖との間で水素結合を形成 (Figure 3-1) する¹⁴。この Con A の性質を利用し、前章で合成したオリゴ糖側鎖型高分子の糖側鎖の生理活性調査を行った。合成した3種類のポリマー(2), (3), (4)に加えて、側鎖型高分子と主鎖型高分子のレクチン認識能の比較を行うために、マルトースが α -1,4結合により主鎖を形成したアミロース(5)についても同様の調査を行った。

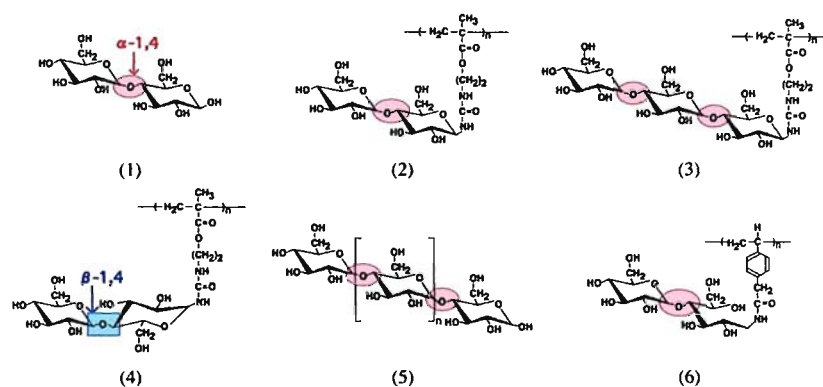


Figure 3-20 Chemical structure of oligosaccharide compounds

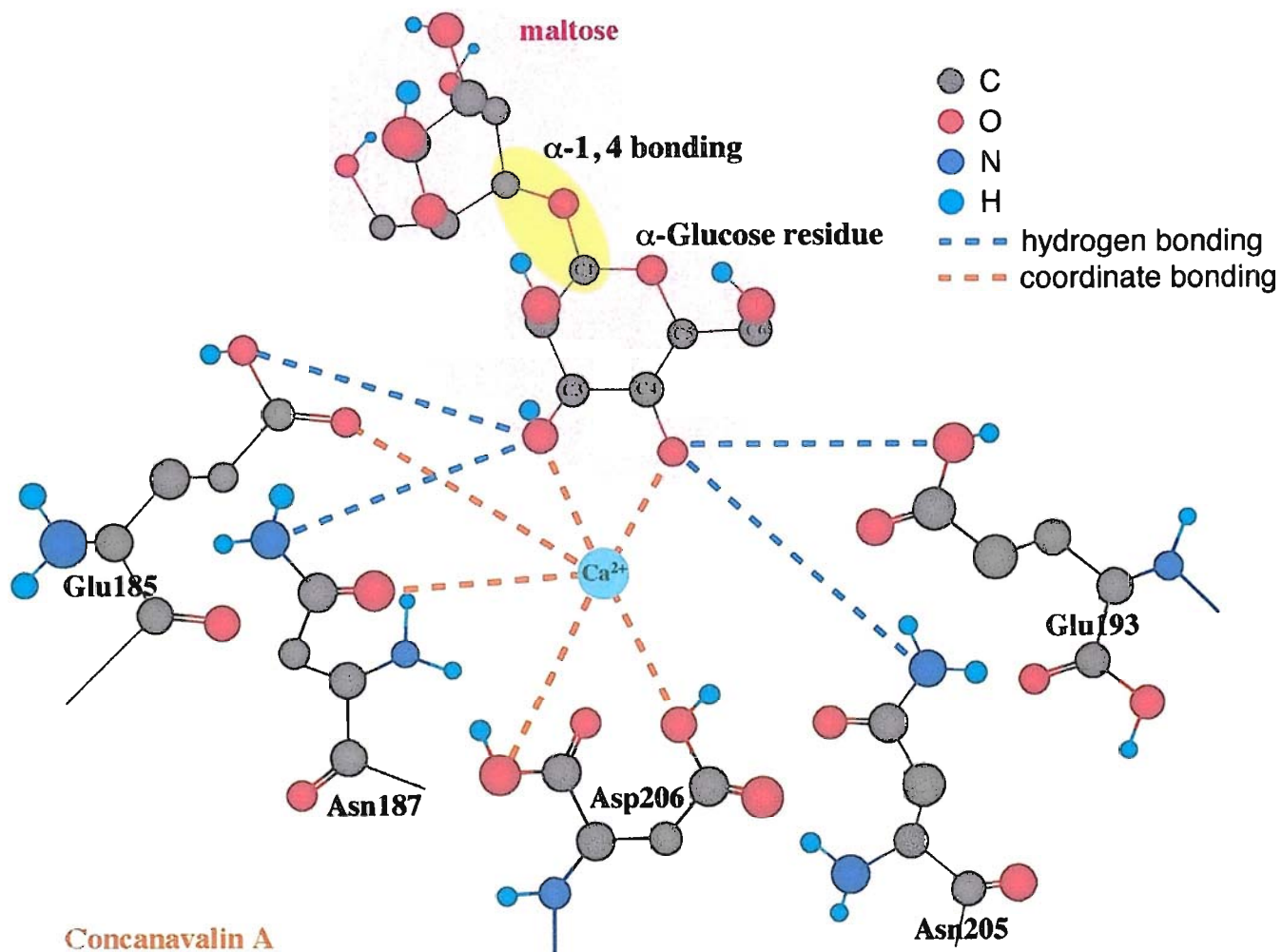


Fig. 3-19 Schematic illustration of the binding of oligosaccharide to Con A

3-5-1 透過率測定による生理活性調査

本項での透過率測定は、紫外可視分光光度計：JASCO V-560 UV/VIS Spectrophotometer を用いた。また、用いた主な試薬を Table 3-1 に示す。

Table 3-1 本章で用いた主な試薬及び溶媒

試薬名	会社名	カタログNo.
0.05 mol/l トリス塩酸緩衝液	和光純薬工業 (株)	018-03282
塩化カルシウム	和光純薬工業 (株)	039-00475
コンカナバリンA	生化学工業 (株)	30036-2
マルトース	和光純薬工業 (株)	130-00615
アミロースEX-I	生化学工業 (株)	400620-2
PV-MA	生化学工業 (株)	400365

まず、オリゴ糖ポリマーとレクチンの相互作用の経時変化を調査した。塩化カルシウム 27.75 mg をトリス塩酸緩衝液に 250 ml に溶解し、1mM 塩化カルシウム/トリス塩酸緩衝液 (I) を調製し、Concanavalin A (Con A) 50 mg を I 100 ml に溶解し 0.5 mg/ml Con A 溶液 (II) を調製した。また、poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose) 5 mg を I 10 ml に溶解 (1×10^{-6} unit mol/ml, III) し、III から 50ml (5×10^{-8} unit mol), 100ml (1×10^{-7} unit mol), 500ml (5×10^{-7} unit mol) を採取し、それぞれに II を 1.5 ml ずつ加え、25°C で 15 分おきに 2 時間透過率測定を行った。測定の結果、Figure 3-21 に示すように、これら濃度において 15 分以降の透過率の減少、及び増加は見られなかった。そのため、poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose) と Con A の結合による白濁現象は 15 分で終息したと考えられる。

次に下記に従い、各種糖ポリマーの調査溶液を調製した。Poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose) 5 mg を、先に調製した I 10 ml に溶解 (1×10^{-6} unit mol/ml, III) し、さらにその溶液から 100 ml を採取し I 10 ml と混合 (1×10^{-8} unit mol/ml, IV) した。その後、Table 3-2 に示すように II, III, IV 溶液を混合して各種濃度に調製した。poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido maltotriose), poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose), maltose, amylose, PV-MA についても III, IV と同様の濃度溶液を調製し、Table 3-2 に従って各種濃度溶液を調製した。

Table 3-2 Preparation of various oligosaccharide solution

	糖添加量(unit mol)	溶液 II (ml)	溶液 III(μl)	溶液 IV(μl)
a	1×10^{-10}	1.5	—	10
b	5×10^{-10}	1.5	—	50
c	1×10^{-9}	1.5	—	100
d	5×10^{-9}	1.5	—	500
e	1×10^{-8}	1.5	—	1000
f	5×10^{-8}	1.5	50	—
g	1×10^{-7}	1.5	100	—
h	5×10^{-7}	1.5	500	—
i	1×10^{-6}	1.5	1000	—

各糖マクロマーの a~i 濃度溶液をそれぞれ 25°C で 1 時間静置させ、透過率測定を行った。Figure 3-22 に示すように、poly(2-(methacryloyloxy) ethylureido maltose), poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido maltotriose), PV-MA において透過率の減少が確認された。その原因としては、 α -グルコース残基と選択的に結合する Con A が、ポリマー側鎖のマルトース、マルトトリオースの α -グルコース残基と結合し、架橋構造を形成したためと考えられる。加えて、poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose), poly(2-(methacryloyloxy) ethylureido maltotriose)においてそれぞれ一定濃度以上になると沈澱の凝集による透過率の上昇が確認されたが、PV-MA は凝集せずに分散したままであったことから、今回合成したイソシアネート誘導ビニルポリマーは、より強い結合能を示すことが示唆された。また、maltose, amylose が α -グルコース残基を有するにも関わらず透過率の減少が確認されなかったことについては、Con A との結合が生じて α -グルコース残基が片末端にしか存在せず、架橋構造が形成できないことが原因だと考えられる。poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose)においては、 α -グ

ルコース残基を有していないため、Con A との結合が起こらず透過率の減少は見られなかった。加えて Fig. 3-23 及び Fig. 3-24 に各種サンプルの写真を示す。これらの結果から、合成した糖側鎖型ポリマーの糖側鎖は生理活性を維持しており、さらに主鎖型ポリマーに比べて強い結合能を持つことが示唆された。

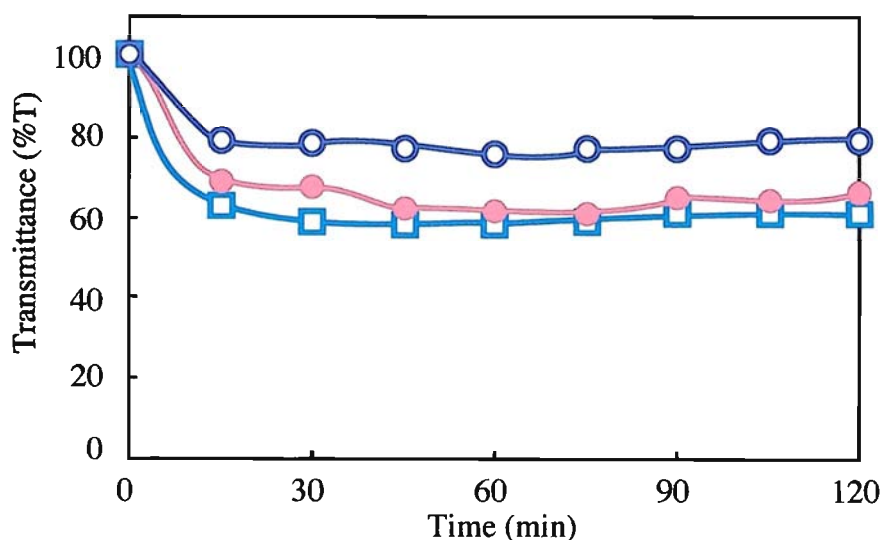


Figure 3-21 Turbidities of obtained poly(2-methacryloyloxy)ethylureido maltose at 500 nm. (○) 5×10^{-8} unit mol, (●) 5×10^{-8} unit mol, and (□) 5×10^{-8} unit mol

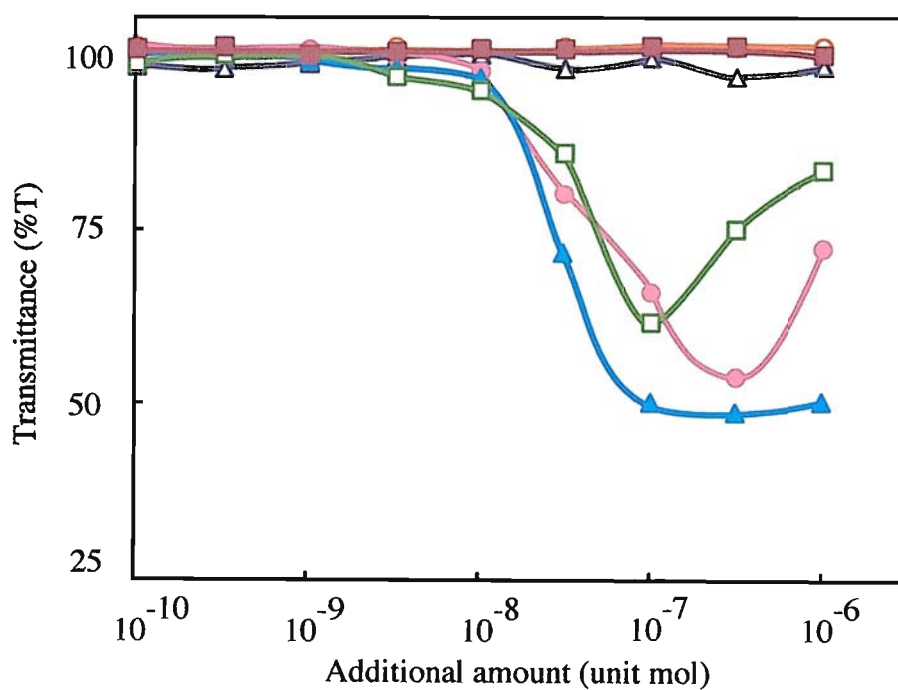


Figure 3-22 Turbidities at 500 nm. (○) maltose, (●) poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose), (□) poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido maltotriose), (■) poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose), (△) amylose, (▲) PV-MA

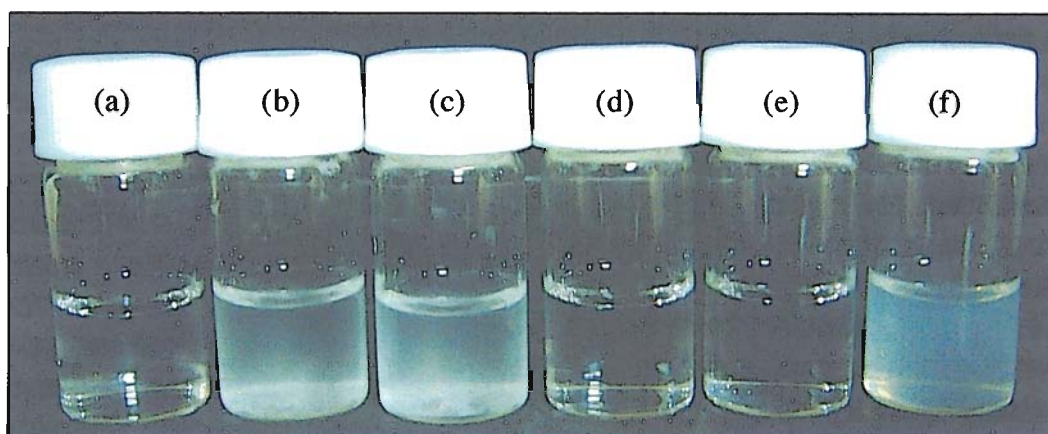


Figure 3-23 Picture of white turbidites comparison of 1×10^{-6} unit mol. (a) maltose (b) poly(2-(methacryloyloxy)ethylureid maltose) (c) poly(2-(methacryloyloxy)ethylureid maltotriose) (d) poly(2-(methacryloyloxy)ethylureid cellobiose) (e) amylose (f) PV-MA

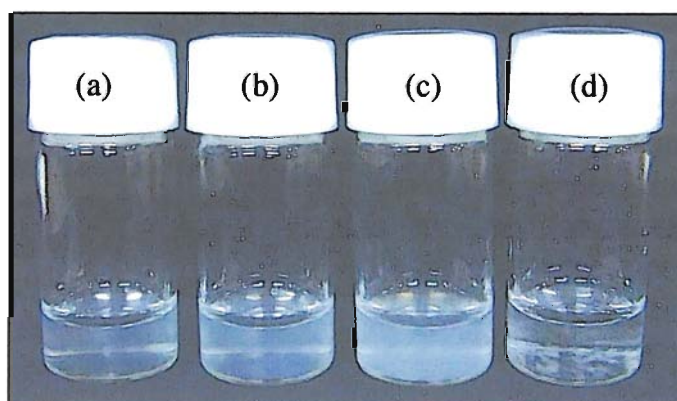


Figure 3-24 Picture of white turbidites of obtained poly(2-(methacryloyloxy)ethylureid maltose). (a) 5×10^{-8} unit mol (b) 1×10^{-7} unit mol (c) 5×10^{-7} unit mol (d) 1×10^{-6} unit mol

3-6 示差走査熱量測定 (DSC) による水の状態評価

3-6-1 はじめに

ヒドロゲル中の水の状態はゲルの構造や機能とも関係するので、さまざまな観点から研究されている。DSC を用いると、ゲル中の異なる状態の水を定量することができる⁴⁶⁾。畠山ら⁴⁷⁾ は種々の高分子/水系のDSC測定を行い、純水の結晶化エンタルピーの値を用いて、系中の水の結晶化熱から水の定量化を試みている。少量の水を吸着している親水性高分子では、通常の水の結晶化よりも低温側に高分子に束縛されている水の結晶化が観察されることから、高分子中の水を自由水、束縛水、不凍水の三種類に分類した。ヒドロゲルのように大量の水を含む場合には、自由水と束縛水とをDSC測定から分離して定量化するのは困難であるが、0℃以下で融解する水を束縛水と考えDSCの融解曲線から分離した例⁴⁸⁾もある。

ここでは、cellobiose, poly 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose), poly (GEMA) 中の水の状態をDSC測定により評価した。

3-6-2 サンプル調製と DSC 測定

密閉型 Al セルに試料を 5 mg 秤量し、続いて蒸留水 5 ml を滴下して加え、測定サンプルとした。DSC 測定条件を以下に示す。

試料重量	5 mg + 5 ml
試料容器	密閉型 Al セル
温度範囲	-50 ~ 50 °C
昇降温速度	1.0 °C / min
昇降温回数(Scan)	4 回

DSC 測定装置

DSC ユニット： Seiko Instruments Inc EXTRA 6000 DSC 6200

冷却ユニット： HAAKAE EK90/SII

得られた DSC 曲線を Figure 3-25 に示す。純水では, 0 °C に鋭い融解ピーク ($\Delta H=396.41$ mJ / mg) が観察されるが, cellobiose 中の水の融解ピークはシャープに観察された。これは水が cellobiose に束縛されず自由な状態にあることを示しており, scan を重ねてもピークトップの温度, ピークトップの高さ, ΔH に大きな変化はみられなかった。poly (GEMA) では, ピークがブロードになっており, scan を重ねるとピークトップの温度, ピークトップの高さ共に増加した。しかし, ΔH に関しては, 大きな変化はみられなかった。それに対して poly 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose) では, ピークトップの温度に大きな変化はみられなかったが, poly (GEMA) に比べて ΔH の値が高く, より不凍水の割合が少ないと考えられる。scan を重ねるにつれてピークトップの高さ, ΔH が増大し, 水が自由水に近づいていく特異性が観察された。

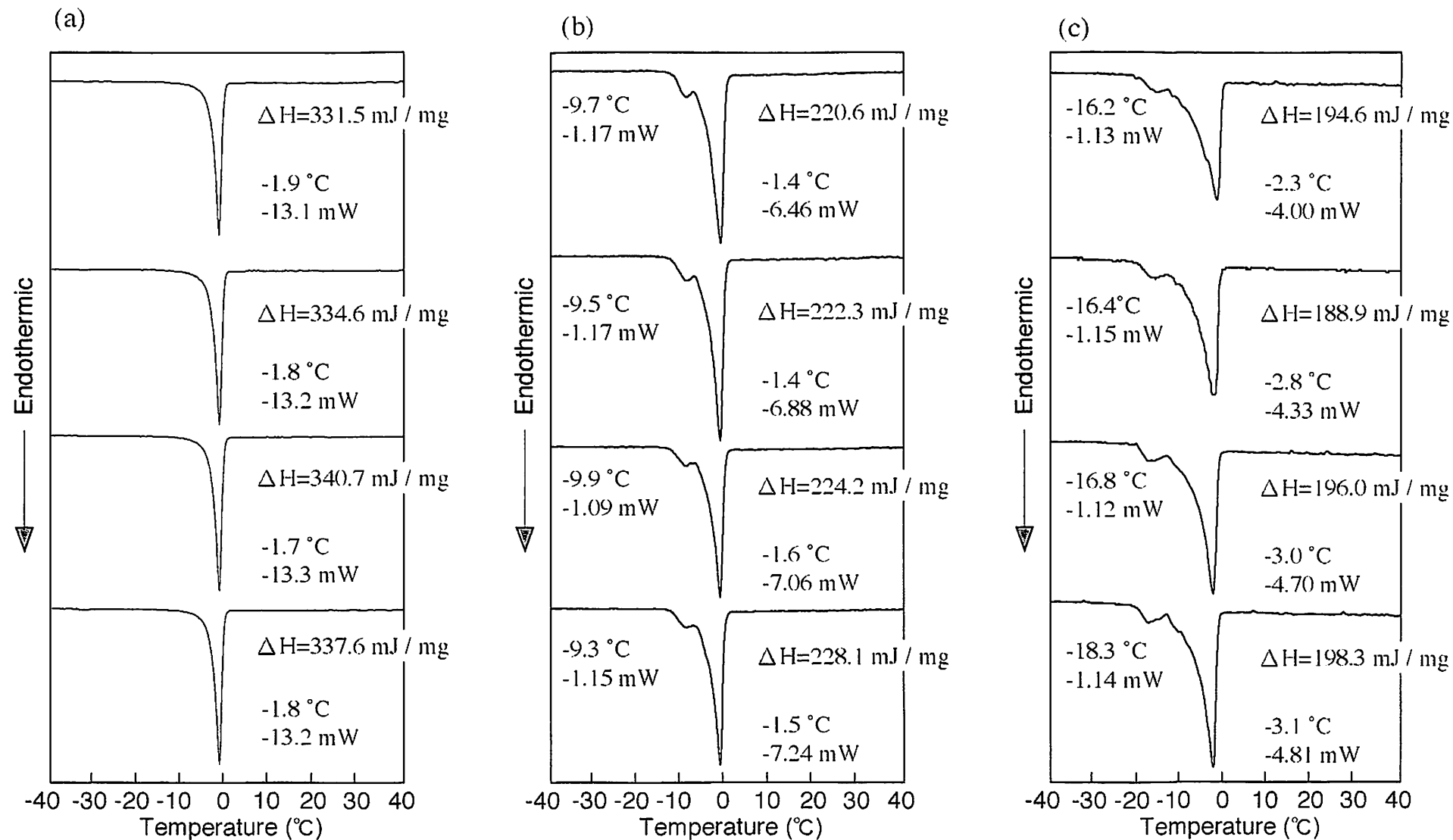


Figure 3-25 Difference scanning calorimeter thermograms of (a) cellobiose, (b) poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose) and (c) poly(GEMA)

3-7 集合形態の直接観察

3-7-1 ポリマー溶液の調製と観察サンプルを作成

3-2-1-2 で合成した poly 2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose 10 mg を超純水 10 ml (1mg/ml) に溶解させ、0.45 mm の ADVANTEC 製ディスクフィルター(親水性 PTFE 基質, 13HP045AN) でろ過した。この溶液を、支持膜作成後カーボン蒸着、イオンコーティング処理した銅メッシュにマイクロピペットを用い微量を滴下した。所定時間後、ろ紙を用いて水分を吸い取り乾燥後に 2.0 w% モリブデン酸アンモニウム水溶液を銅メッシュ上に滴下し乾燥させ観察サンプルとした。さらに、0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml の濃度の観察サンプルも作成した。集合形態の直接観察には透過型電子顕微鏡を用いた。

3-7-2 透過型電子顕微鏡観察

得られた透過型電子顕微鏡写真を Figure 3-26 に示す。(a) ~ (c)に示す 1mg/ml のサンプルでは 10 ~ 30 nm の粒子が多数観察された。(b)を(d)比較すると 30 nm 付近の粒子の現象が見られた。さらに(c)を(e)では粒子サイズの現象が見られた。いずれの写真にも確認される 10 nm 以下の粒子は、(c)に示される 30 nm 付近の粒子への成長過程であると考えられる。さらに粒子内部まで染色されていないことから、この集合体は、染色剤が集合体内部にまで入り込めない程度の分子間水素結合を有することを示唆している。

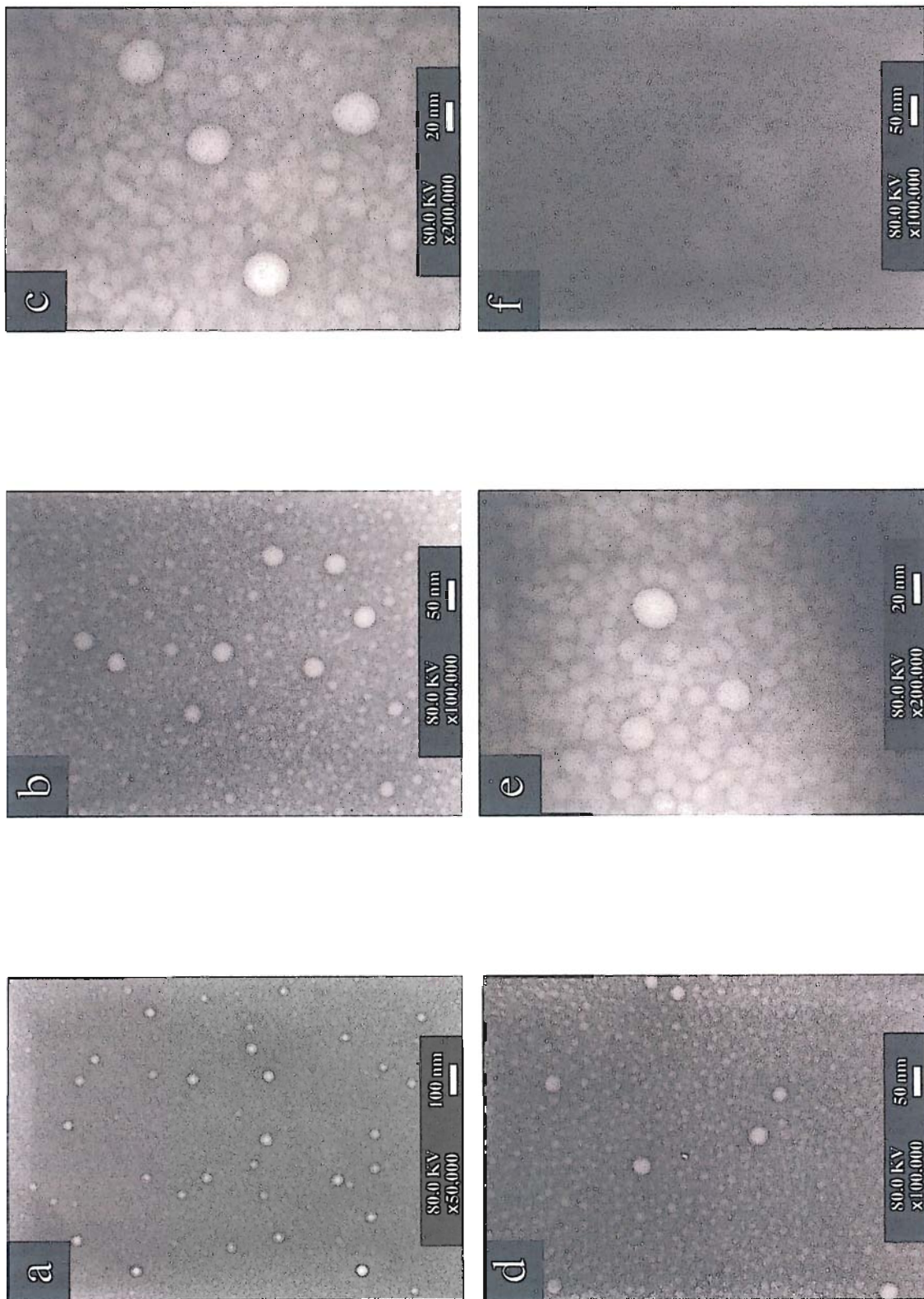
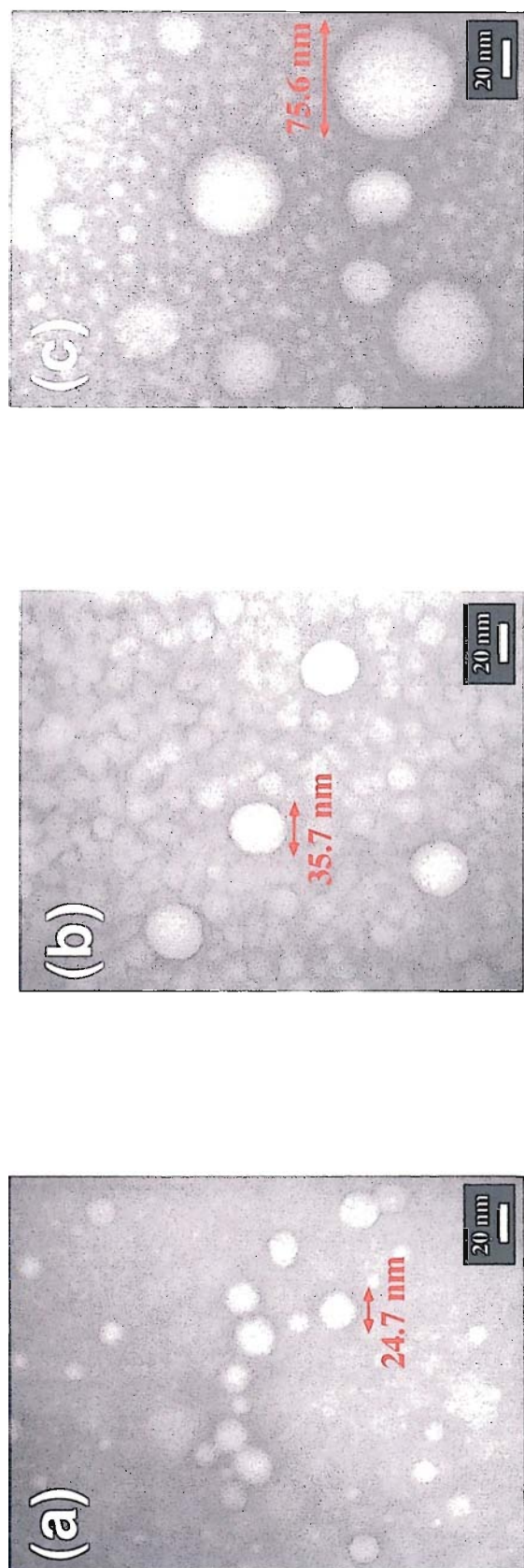
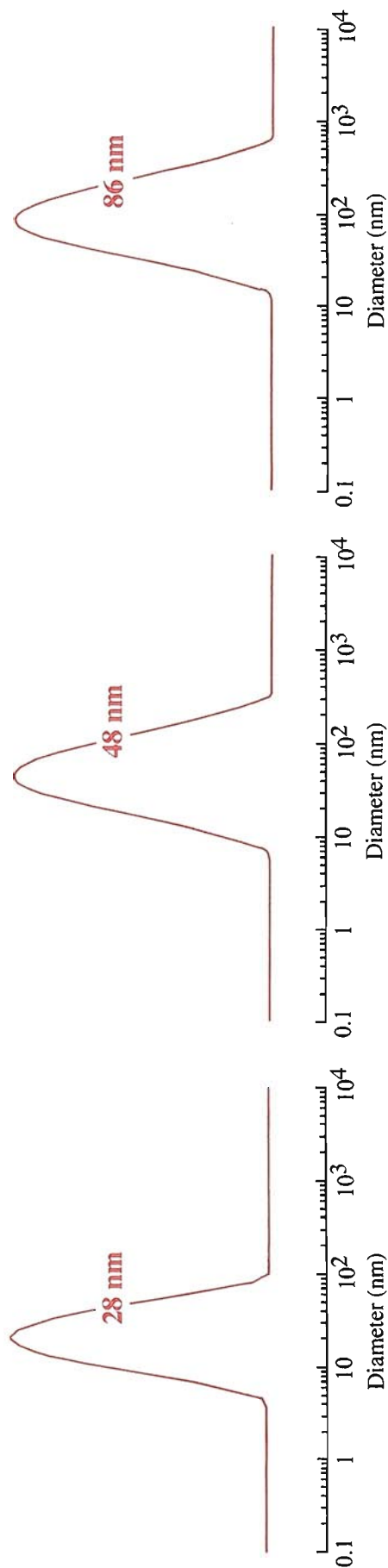


Figure 3-30 Transmission electron micrographs of poly 2-(methacryloyloxy) ethylureido cellobiose in aqueous solution. Initial concentrations : (a) ~ (c) 1 mg/ml, (d) and (e) 0.01 mg/ml, (f) 0.001 mg/ml.



Transmission electron micrographs of obtained polymers in aqueous solution. Initial concentrations : 1.0 mg/ml, stained with 2.0 wt% aqueous ammonium molybdenate.



第四章

両親媒性オリゴ糖ポリマーの合成と物性評価

4-1 はじめに

両親媒性化合物は溶媒分子との相互作用が弱い疎媒基と、相互作用が強い親媒基で構成されており、選択溶媒中で疎媒基が凝集してコアを形成し、親媒基がその周りを取り囲んだ分子会合体を形成することが知られている。例えば、SDSなどの比較的 low molecular weight の界面活性剤が水溶液ミセルを形成すること⁵⁶⁾、また天然由来脂質⁵⁷⁾や種々の合成脂質⁵⁸⁾が2分子膜を基本とした会合体を形成することはよく知られている。近年、機能的両親媒性分子が数多く設計され、そのナノ組織体の機能が活発に研究されている。

本章では、先に紹介した 2-(methacryloyloxy) ethyl ureido cellobiose (以後、CMU と略記) のホモポリマーが形成する球状の会合体をさらに、安定化させるために、このポリマーに疎水基を導入することによって、疎水効果も付与した、球状の会合体を形成させることを目的とした。具体的には、長鎖アルキル基を有するメルカプタンをテロゲンに用いて、CMU のテロメリゼーションを行うことにより、水溶性ポリマー主鎖の末端に疎水基を有する両親媒性高分子の調製を行った。また、CMU のホモポリマー側鎖に長鎖アルキル基を導入した両親媒性高分子の調製を行った。さらに、水溶性の多糖類であるでんぷん・プルランに長鎖アルキル基を部分的に導入した化合物をそれぞれ調製し、それら化合物での物性の調査を行い、比較検討した。

4-1-1 両親媒性高分子

高分子の両親媒性化合物において、非常に高度な機能を発現しているその代表的な例は、生体高分子である。例えば、たんぱく質のように疎水性と親水性のモノマー（アミノ酸）が交互またはブロック的に重合したもの、核酸のようにモノマー単位に親水性部位（糖とリン酸）と疎水性部位（核酸塩基）両方を有したもの、また細胞壁を形成するリポ多糖のように水溶性の高分子（多糖）に部分的に疎水性の長鎖アルキル基が結合したものなどが挙げられる。生体系では、両親媒性の特性とその他の弱い相互作用をうまく利用して、高分子の二次構造形成やコンパクトに折り畳まれた三次構造形成、さらにこれら生体高分子間の会合および解離を制御している。その結果、様々な機能が巧みに制御され、生命現象が円滑に営まれている。こうした背景のもと、様々な構造をもつ両親媒性高分子の合成・解析、とりわけ、水中での会合挙動に関する研究が多くなされている。また、たんぱく質のコンパクト

なフォールディング構造のモデルとしての興味からも、疎水性モノマーと電解質モノマーからなる両親媒性共重合体も古くから研究されてきた。会合体の構造解析に関する手法が発達した最近では、森島⁵⁹⁾らが、嵩高い疎水基であるアダマンチル基やシクロドデシル基などを50 mol%有するアクリルアミド系の両親媒性高分子電解質（分子量：約50万）では、高濃度においても分子内でコンパクトに自己組織化したユニマーミセルを形成することを光散乱，小角X線散乱，小角中性子散乱，体積排除クロマトグラフィー，粘度，粘弾性，蛍光プローブ，NMR緩和時間，各種顕微鏡観察によるモルホロジー観察など種々の実験により証明している。

複数の分子が集合して，高分子ミセルが形成されることを先に述べた。これらは，界面自由エネルギーを最小にするように秩序化し，相分離が起こり，表面が形成される。この原理を利用して，微粒子調製法が多数提案されてきた。中でも，秋吉らの研究は超微粒子の領域において，新しい提案となった。水溶性高分子主鎖に疎水基を部分置換した疎水化親水性高分子の自己組織化⁶⁰⁾である。水溶性の多糖やポリアミノ酸に会合性の強い疎水性基のコレステロール基を5 wt%以上置換すると，希薄水溶液中で分子間会合して，20~30 nmの範囲で単分散ナノ微粒子が形成されることを報告している。疎水基の会合領域が架橋点となり，高分子の種類，分子量，疎水基の置換度，構造を変えることで，会合数，粒子径，密度および架橋領域の分布を制御できる。また，この粒子はたんぱく質と制御されたホスト-ゲスト系をつくり，耐性酵素，人工ワクチン，ドラッグデリバリーシステム（DDS）の薬物キャリアなどへ展開された⁶¹⁾。片岡ら^{62, 63)}は，親水性高分子と疎水性高分子とからなる親水-疎水型のブロックポリマーの自己組織化による数十nmサイズの高分子ミセルを提案し，これをコア・シェル型と呼んでいる。調製したブロックポリマーPEG- β -PLAは，水中で20~40 nmの疎水性高分子セグメントをコアにもつ単分散ポリマーミセルを形成し，H⁺で容易に加水分解して表面にアルデヒド基をもつコア・シェル型反応性ナノスフェアがつくられた。また，粒子のコア形成の駆動力として静電性を用いた，ポリイオンコンプレックスミセルも形成できる。

さらに，100~200 nm径の微粒子が，親水性マクロモノマーと疎水性コモノマーのラジカル共重合によって得られる。重合はマクロモノマーとコモノマーが均一系で開始し，成長する疎水部が秩序化を駆動力に集合してガラス状コアを形成し，そこから親水部がコロナ状に外に向いている層構造の粒子である。重合条件により単分散性を保ったまま粒径を制御できる⁶⁴⁾。また粒子の機能発現の場となるコロナ部

にノニオン性, カチオン性, アニオン性, 感熱応答性を持たせることができる^{65,66)}。
コア・コロナ型粒子の機能材料への応用として, ペプチド医薬の径口 DDS, ウィルス捕捉システム, 触媒粗体などへの展開が行われている⁶⁷⁾。

4-2 両親媒性オリゴ糖ポリマーの合成

先に合成した糖ポリマーの高分子主鎖の片末端のみに疎水基を導入する方法にテロメリゼーション法がある。テロメリゼーション法とは J.Harmon によりにつぎのような型の反応と定義された。

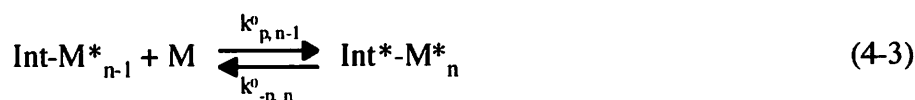


ここに、XY をテローゲン (telogen), M をタクソーゲン (taxogen), X-M_n-Y をテロマー (telomer) という。テロメリゼーションを構成する素反応は、開始反応、生長反応および連鎖移動反応の三つである。テロメリゼーションを行わせると多くの場合停止反応が起こるがそれは本質的なものではない。あるテローゲンとタクソーゲンの組み合わせについてテロメリゼーションが起こるためには、この両者以外に活性種を作り出す化合物、すなわちこの反応を開始させる化合物またはそれに代わるものが必要である。開始剤またはそれから生成される活性種を記号 Int* と表し、典型的なテロメリゼーションについて素反応を考える。ここでは * 印はラジカル、カチオン、またはアニオンを意味するものとする。

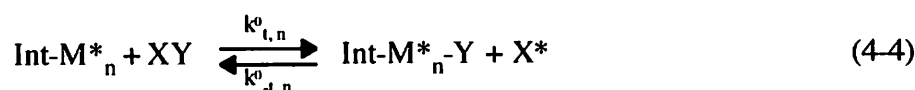
開始反応 (initiation reaction)



生長反応 (propagation reaction)



連鎖移動反応 (chain transfer reaction)



式 (4-4) において生成する反応中間体 X* は M と反応しうる場合もそうでない場合もあるがテロメリゼーションが起こるためには X* と M が反応することが必要である。そこで X* と M が反応する場合についてさらに考察を進める。

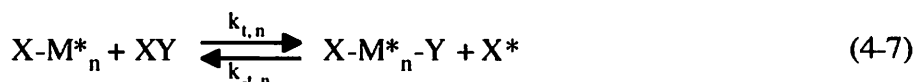
再開始反応 (re-initiation reaction)



生長反応 (propagation reaction)



連鎖移動反応 (chain transfer reaction)



$Int-M_n^*$ に関して (4-3) と (4-4) は競争反応である。今簡単のために速度定数が n に依存しないと仮定する。もし、

$$k_p^0 - k_{-p}^0 \gg k_t^0 - k_{-t}^0 \quad (4-8)$$

ならば、 XY はその重合系において不活性溶媒と同じような働きをすることになり、その系では通常の意味でのポリマーが得られる。式 (4-8) が成立しないときは、連鎖移動反応 (4-4) が起こって新しい活性点 X^* ができるが、このとき X^* が M と反応しないならばそこでその反応は停止し、 XY が重合停止剤あるいは禁止剤として働いたことになる。逆に X^* が M と反応するときは、 $X-M_n^*$ が生成し、これに関して (4-6) と (4-7) が競争反応になる。末端基 X の $k_{p,n-1}$, $k_{p,n}$, $k_{t,n}$ および $k_{-t,n}$ に対する効果がとくに大きい場合を除くと近似的に $k_{p,n-1}^0 = k_{p,n-1}$, $k_{-p,n}^0 = k_{-p,n}$, $k_{t,n}^0 = k_{t,n}$ および $k_{-t,n}^0 = k_{-t,n}$ と考えてよいから、式 (4-8) が成立しないときは次式も成立しない。

$$k_p - k_{-p} \gg k_t - k_{-t} \quad (4-9)$$

したがって、 $[M]/[XY]$ を調節することにより、生長速度 R_p と連鎖移動速度 R_t との比 R_p/R_t を

$$\frac{R_p}{R_t} = \frac{(k_p - k_{-p})[M][X-M_{n-1}^*]}{(k_t - k_{-t})[XY][X-M_{n-1}^*]} \cong 1 \sim 10 \quad (4-10)$$

とすることができる。このように生長反応速度と連鎖移動反応速度がバランスを保っているときに、テロメリゼーションが起こる。一般に、反応が進むにつれて[M]/[XY]が変化するので、テロメル化度 T_n (degree of telomerization) を次式によって定義すると、 T_n は[M]/[XY]の関数となる。

$$T_n = \frac{R_p}{R_t} \quad (11)$$

このように、この手法を用いることによって疎水部と親水部のバランスをコントロールすることが可能である。

4-2-1 C_m -(CMU) $_n$ の調製

Table 4-1 本節で用いた主な試薬

試薬名	会社名	カタログ No.
1-オクタデカンチオール	和光純薬工業 (株)	322-21692
1-ドデカンチオール	和光純薬工業 (株)	126-02752
AIBN	ナカライテスク (株)	03602-72
DMF	国産化学 (株)	2591057
ジメチルアニリン	ナカライテスク (株)	12911-42
過酸化ベンゾイル	ナカライテスク (株)	04422-02
ジエチルエーテル	ナカライテスク (株)	15401-45
Spectra / Poa 3	フナコシ (株)	FED-132720

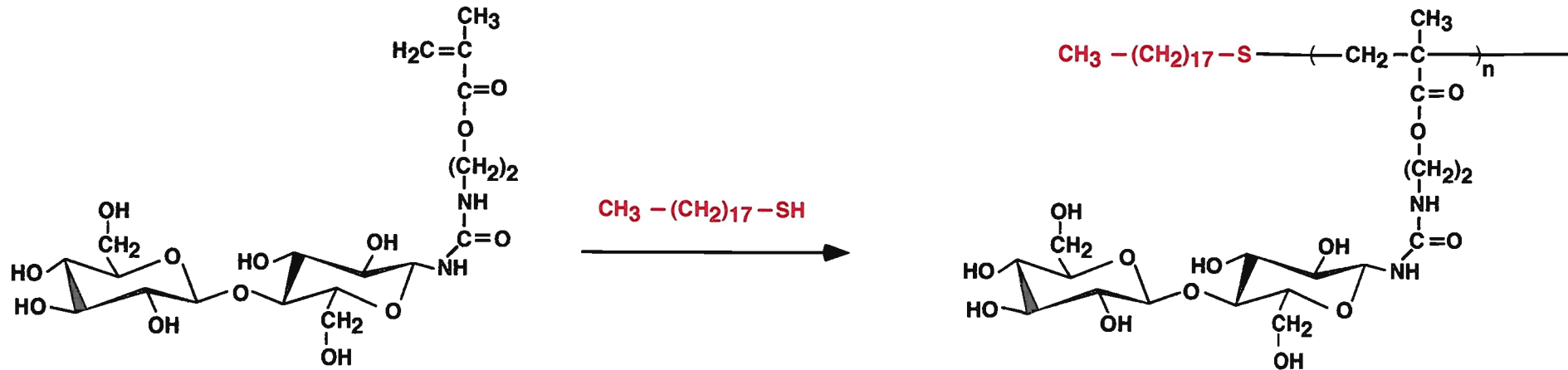
CMU 1 g (78.62 %, 1.584 mmol), 1-オクタデカンチオール所定量を 25 ml 三口フラスコ中, DMF 5 ml に溶解し, 60°C で 30 分間窒素通気を行った。AIBN 0.01 g / DMF 1 ml 溶液を加え, 60°C のまま 24 時間かき混ぜた。かき混ぜ終了後, 析出物をろ別し, ろ液をジエチルエーテル 100 ml に滴下することにより, 白色の沈殿が確認された。遠心分離後, デカンテーションにより溶液を除去し, 減圧乾燥を行った。得られた黄白色固体を水数 ml に溶解させ, 3 日間透析により精製し, 凍結乾燥することにより, 白色固体を得た。この操作を 1-オクタデカンチオールの仕込み量を変えて行った ((1) ~ (7))。また, 開始剤にレドックス開始剤であるジメチルアニリン/過酸化ベンゾイルを用いた系 ((8) ~ (10)), 溶媒を DMF/シクロヘキサンの系 ((10) ~ (13)) で

行った。さらに、テローゲンに1-ドデカンチオールを用いた系((14)～(15))を行った。詳細をTable 4-2に示し、生成物のFT-IRスペクトルをFigure 4-1に示す。FT-IRスペクトルでは2800 cm⁻¹～3000 cm⁻¹にかけて脂肪族のC-H伸縮振動に由来するピークより、アルキル基の導入を確認した。(1)～(7)で比較すると、収量・導入量ともに、仕込み比とは無関係であることがわかる。また、再現性も得られなかった。先に山田らは、*n*-ドデシル化合物をテローゲンに用いたアクリルアミドなどとのテロメリゼーションにおいて、重合度2程度のテロマーしか得られないことを報告している。これは、反応系で連鎖移動剤に活性点に移っても、この活性点が再びタクソゲンと反応しないためだと推測されている。おそらく、疎水的なテローゲンと親水的なタクソゲンとでテロメリゼーションを行った場合、重合の進行が困難であることが予想される。そのため、(1)～(7)の場合においても、仕込み比通りのテロマーは得られず、収量も少なかったと考えられる。(8)～(10)においてはレドックス開始剤を用いて行った。連鎖移動定数の高いDMFが重合の進行を妨げていることも考えられたが、(8)の単独重合においては比較的高い収率でポリマーが得られた。テローゲンとモノマーの相溶性を高めるために溶媒にシクロヘキサンを加えて重合を行ったが((11)～(13))、収量、導入量ともに、効果はみられなかった。テローゲンに1-ドデカンチオールを用いた場合((14)～(15))でも効果はみられなかった。そこで、比較的収率よく、また、脂肪族のC-H伸縮振動に由来するピークも確認された(2)を以後の実験に用いた。生成物(2)の元素分析結果をTable 4-3に示す。

Table 4-3 Elemental analysis of C₁₈-(CMU)_n

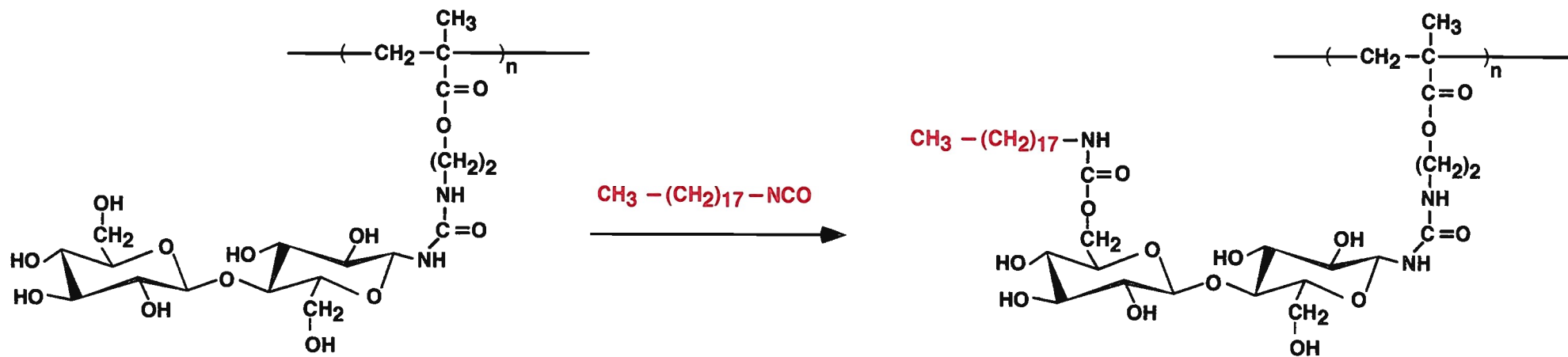
	H (%)	C (%)	N (%)	S (%)
Found	7.41	44.9	4.44	0.959

Table 4-3の結果より、Sの含有率から重合度を算出したところ、平均重合度は5.9と算出された。



Terminal- hydrophobized poly(cellobiose)

96



Partially- hydrophobized poly(cellobiose)

Scheme 4-1 Synthesis of hydrophobized oligosaccharide pendant polymers

Table 4-2 Details of the preparation of $C_m-(MOU)_n$ by teromerization

Conditions of telimerization							
	CMU (g)	CMU C18-SH (mole/mole)	CMU AIBN (wt%)	DMF (ml)	Temp (°C)	Time (hr)	Yield (mg)
(1)	1.00	10.0	1.00	5	60	24	61.6
(2)	1.00	20.0	1.00	5	60	24	77.9
(3)	1.00	30.0	1.00	5	60	24	13.5
(4)	2.00	10.0	1.00	10	60	24	805
(5)	2.00	20.0	1.00	10	60	24	427
(6)	2.00	30.0	1.00	10	60	24	38.2
(7)	2.00	40.0	1.00	10	60	24	766
	CMU (g)	CMU C18-SH (mole/mole)	CMU Redox Initiator (mole/mole)	DMF (ml)	Temp (°C)	Time (hr)	Yield (mg)
(8)	1.00	—	100	5	20	24	414
(9)	1.00	10.0	100	5	20	24	1.70
(10)	1.00	20.0	100	5	20	24	1.00
	CMU (g)	CMU C18-SH (mole/mole)	CMU AIBN (wt%)	DMF/ cyclohexane (ml)	Temp (°C)	Time (hr)	Yield (mg)
(11)	1.00	10.0	100	5/5	60	24	261
(12)	1.00	20.0	100	5/5	60	24	59.4
(13)	1.00	30.0	100	5/5	60	24	29.5
	CMU (g)	CMU C12-SH (mole/mole)	CMU AIBN (wt%)	DMF (ml)	Temp (°C)	Time (hr)	Yield (mg)
(14)	1.00	10.0	100	5	60	24	64.7
(15)	1.00	20.0	100	5	60	24	6.3

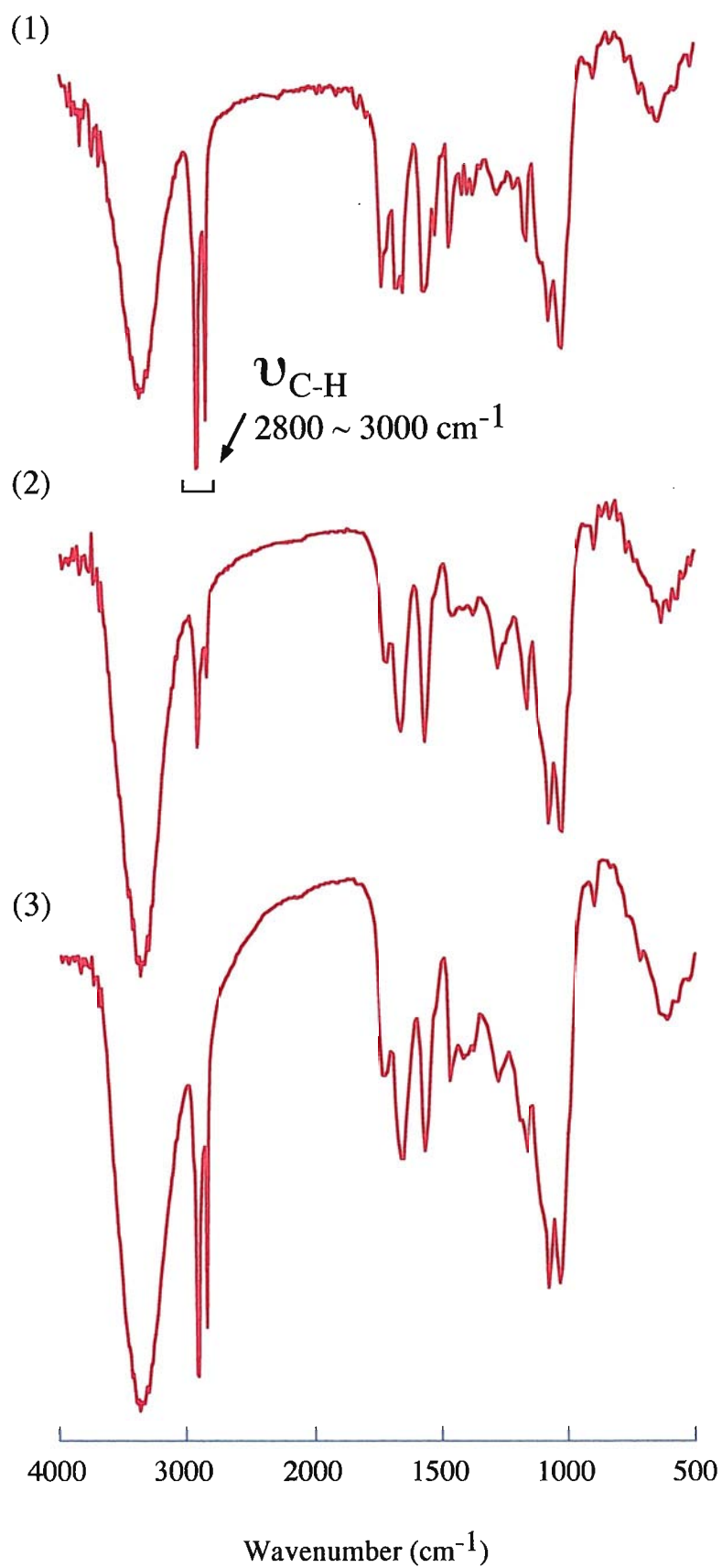


Figure 4-1 FT-IR spectra of $C_m-(CMU)_n$

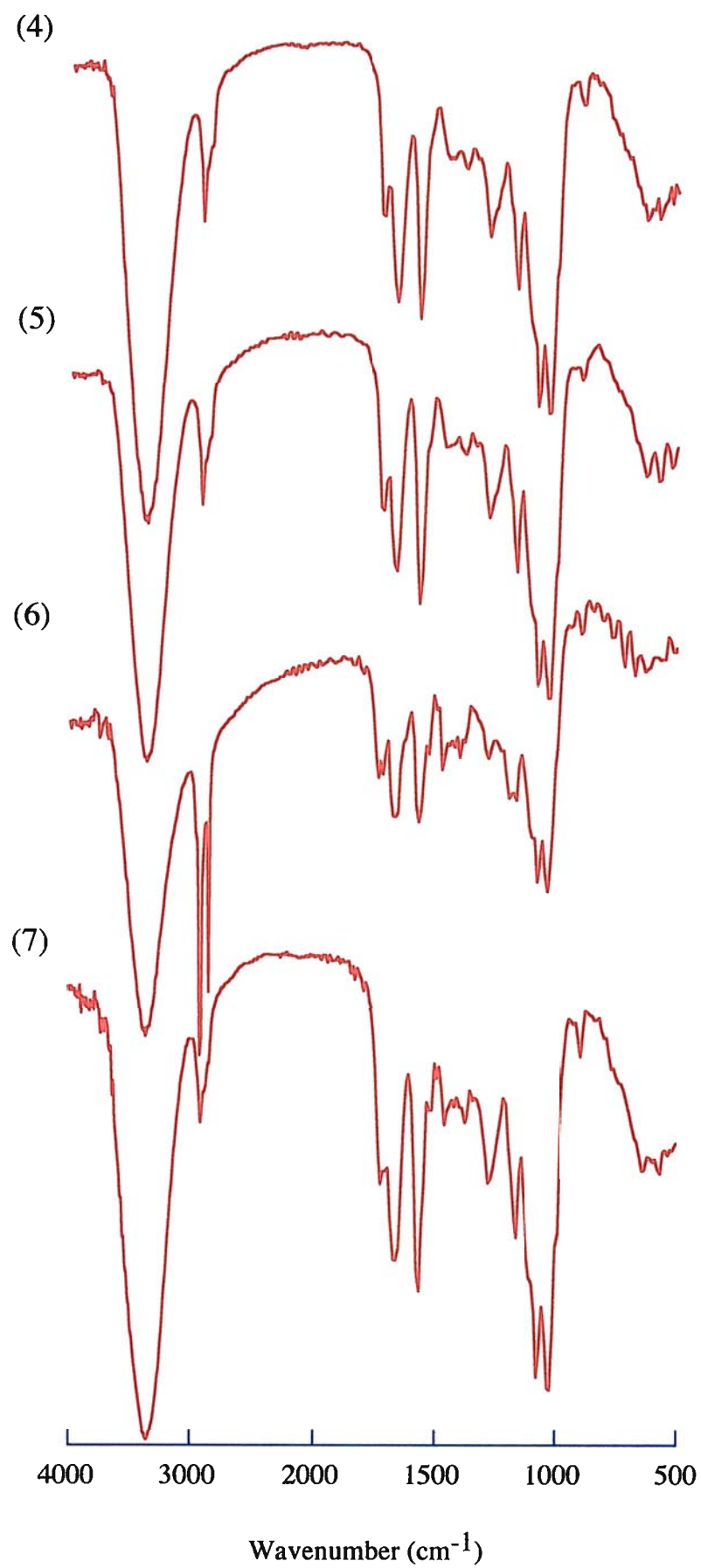


Figure 4-1 FT-IR spectra of $\text{C}_m\text{-(CMU)}_n$

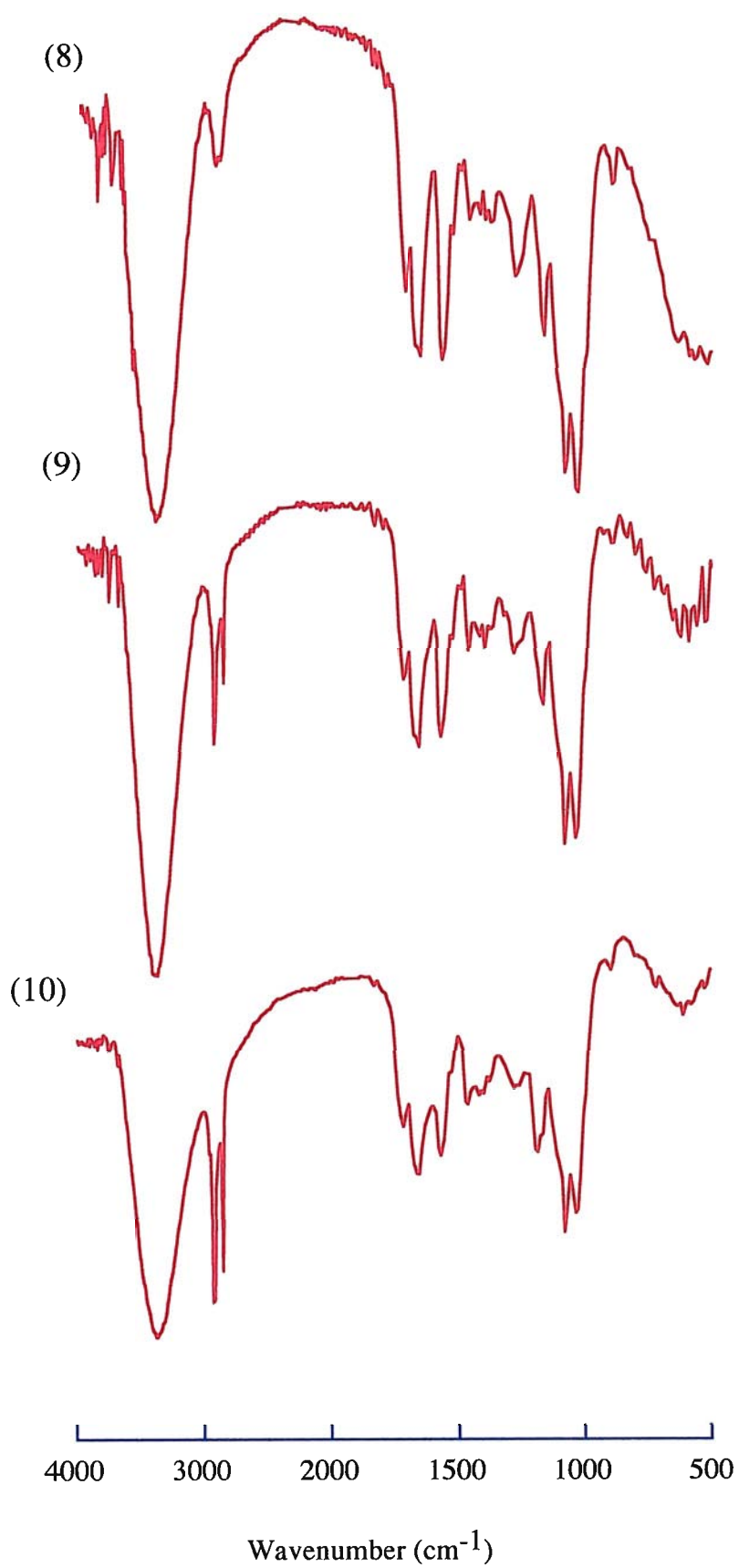


Figure 4-1 FT-IR spectra of $\text{C}_m\text{-(CMU)}_n$

4-2-2 側鎖に長鎖アルキル基を有するセロピオースポリマーの調製

第3章で調製した poly(CMU) 0.5 g (1.0 mmol, モノマー換算) を DMF 2.5 ml, シクロヘキサン 2.5 ml の混合溶媒に加熱溶解し, オクタデシルイソシアネート 0.2978 g (1.0 mmol) を加え 60°C で 8 時間かき混ぜた。析出物はろ過後, ジエチルエーテルで洗浄した後, 減圧乾燥を行った。62.8 mg を得た。ろ液は減圧留去で DMF を除去後, ジエチルエーテルで溶出精製し, 減圧乾燥を行った。収量は 0.236 g であった。元素分析結果を Table 4-4 に示す。

生成物と poly(CMU) の FT-IR スペクトルを Figure 4-2 に示す。生成物のスペクトルには, 2800 cm^{-1} ~ 3000 cm^{-1} にかけて poly(CMU) のスペクトルには確認されない脂肪族の C-H 伸縮振動に由来するピークが確認できる。

これらの結果より置換度は約 1.0 と推定できる。これはモノマー1分子に1つの疎水基が導入された計算である。

Table 4-4 Elemental analysis of C₁₈-poly(CMU)

	H (%)	C (%)	N (%)
Found	7.14	45.6	3.25

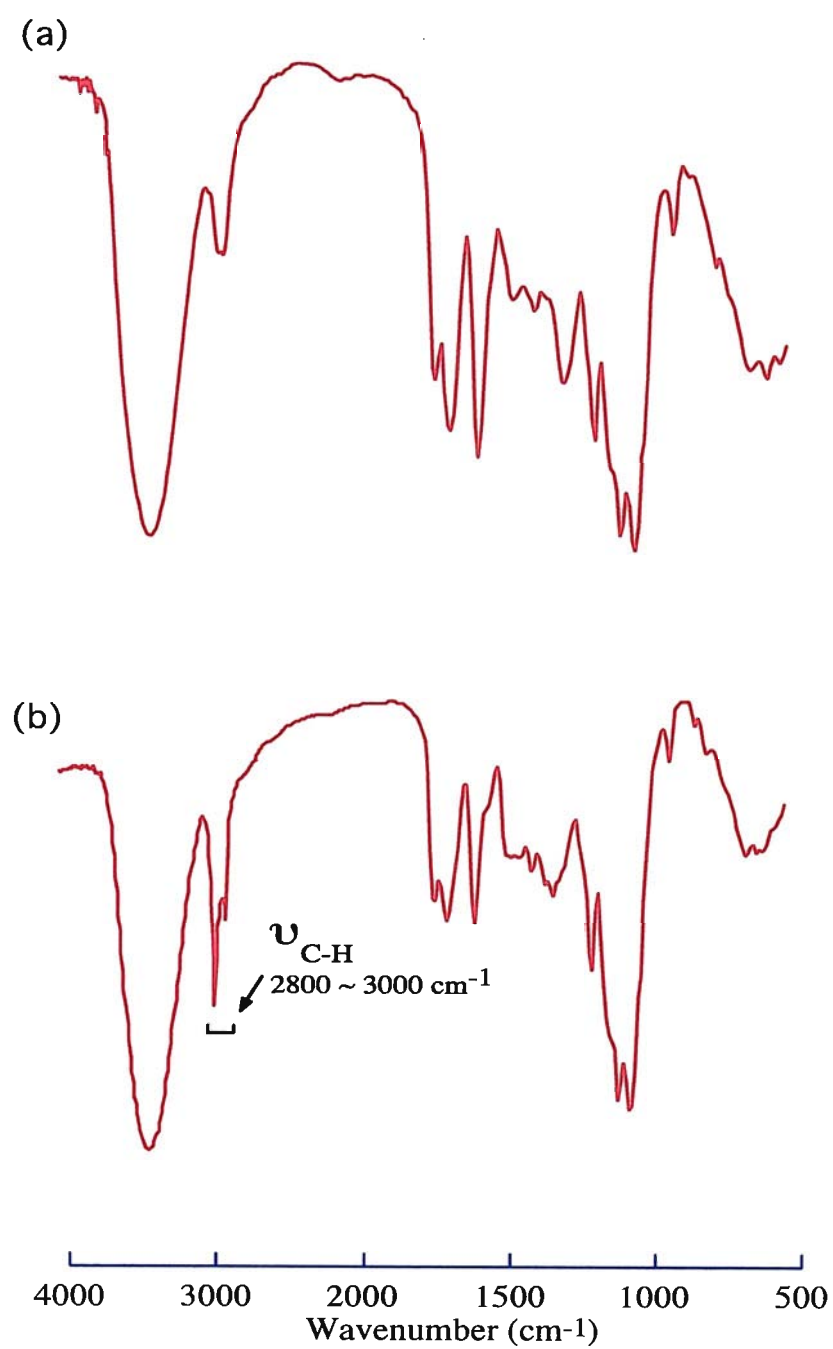


Figure 4-2 FT-IR spectra of (a) poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose) and (b) C18-poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose)

4-3 蛍光プローブを利用した物性評価

ミセル形成に関する研究は古くからなされており、コロイド化学の重要な役割を担っている。ミセルの形成や形態（構造）に関する研究が幅広く行われるようになった当初は、低分子量の両親媒性分子に焦点がおかれてきたが、近年、合成手法の発達に伴い、高分子量の両親媒性分子のミセル（高分子ミセル）に関する研究も盛んに行われるようになった。ミセル構造を解析するために、これまでX線回折、光散乱、SEM、TEMをはじめとした種々の顕微鏡観察、蛍光プローブをはじめとした分光学的手法など様々な手法が用いられ、ミセルの形態やその内部構造、臨界ミセル濃度（critical micelle concentration; CMC）、ミセル形成の熱力学、動力学に関する詳細な知見が得られている。本項では、先に調製した種々の両親媒性糖鎖高分子の疎水基の導入の確認を蛍光プローブにピレンを用いて行った。

4-3-1 蛍光強度測定

分光蛍光測定は、蛍光分光光度計（日本分光社製、FP-6500 spectrofluorometer）を用い20°Cで行った。蛍光プローブにはピレンを用い、最終ピレン濃度が $4.0 \times 10^{-7} \text{M}$ となるように調製した。具体的には、ピレン2.5 mgをクロロホルムで100 mlにメスアップし、ピレン溶液10 μl をサンプル管に入れ風乾した後、各試料の任意の濃度の水溶液を3 ml加えることにより、ピレン含有水溶液を調製した。氷冷しながら内部型超音波を2分間照射した後、20°Cで3時間（蛍光強度が安定するまでの実測時間）静置したものを測定した。測定には1.0 cm x 1.0 cmの角柱石英セルを用いた。測定条件を以下に示す。

測定条件

励起波長：339 nm

蛍光波長：390 nm

励起バンド幅：3 nm

蛍光バンド幅：3 nm

データ取込間隔：0.5 nm

走査速度：100 nm/min

ピレンは高い疎水性を示す物質であり、水への溶解性は極めて低い。そのため、ミセルや類似の超分子システムにみられる疎水性領域の存在下でピレンはこれら会合体の内部へ優先的に可溶し、その光物性を変化させる。これはピレンモノマーの蛍光スペクトルの微細構造（振電バンド）が周囲の環境（極性）に強く依存するためである（Ham effect）。また、ピレンの励起スペクトルはピレンが疎水性領域へ可溶することにより長波長側へシフトする。これは、ピレンの（0,0）バンドが 334 nm (in water) から 339 nm へシフトするためである^{63, 68, 69, 70}。まず、膜タンパク質の可溶化剤として市販されている糖脂質型界面活性剤である *n*-Dodecyl- β -D-maltoside（（株）同仁化学研究所製、以後 DDM と略記）の種々の濃度の水溶液中におけるピレンの蛍光スペクトル、励起スペクトルを Figure 4-3, 4-4 に示す。図から明らかなように、DDM の濃度の増加に伴い、ピレンモノマーの蛍光強度は全体的に増大し、395 nm のピーク強度は 374.5 nm のピーク強度よりも大きくなる。また、励起スペクトルは長波長側へ徐々にシフトした。次に、2-2-2 で調製した poly(CMU) の種々の濃度の水溶液中において、同様の実験を行った。蛍光スペクトル、励起スペクトルを Figure 4-5, 4-6 に示す。ピレンモノマーの蛍光強度は実験誤差範囲の増減しか確認されず、励起スペクトルの長波長シフトも確認されなかった。これより、poly(CMU) 水溶液中では、ピレンを可溶するほどの疎水的な環境が発現されないことが示唆される。

次に、先に調製した C_{18} -(CMU)₅ 水溶液中における測定結果を Figure 4-7, 4-8 に示す。DDM 水溶液中での測定結果と同様、ピレンモノマーの蛍光強度の全体的な増大並びに、励起スペクトルの長波長シフトが確認された。加えて、 C_{18} -poly(CMU) 水溶液中における測定結果を Figure 4-9, 4-10 に示す。これらの水溶液中においても前述の結果と同様に、水溶液中で疎水的な環境を有する会合領域が発現されていることが確認された。

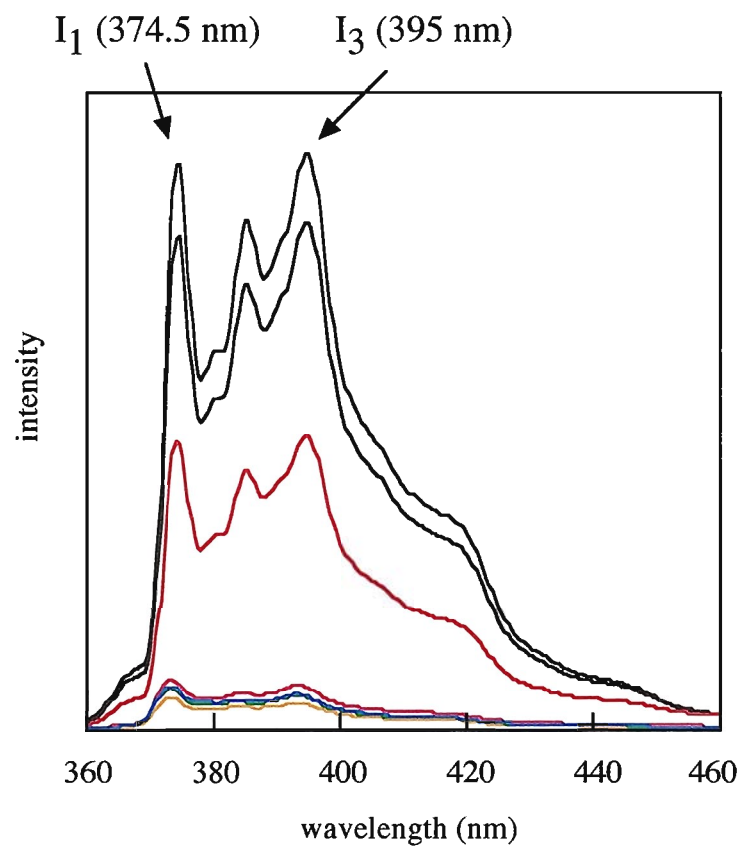


Figure 4-3 Fluorescence spectra of pyrene as a function of DDM concentration in aqueous solutions. Excitation wavelength is 339 nm.

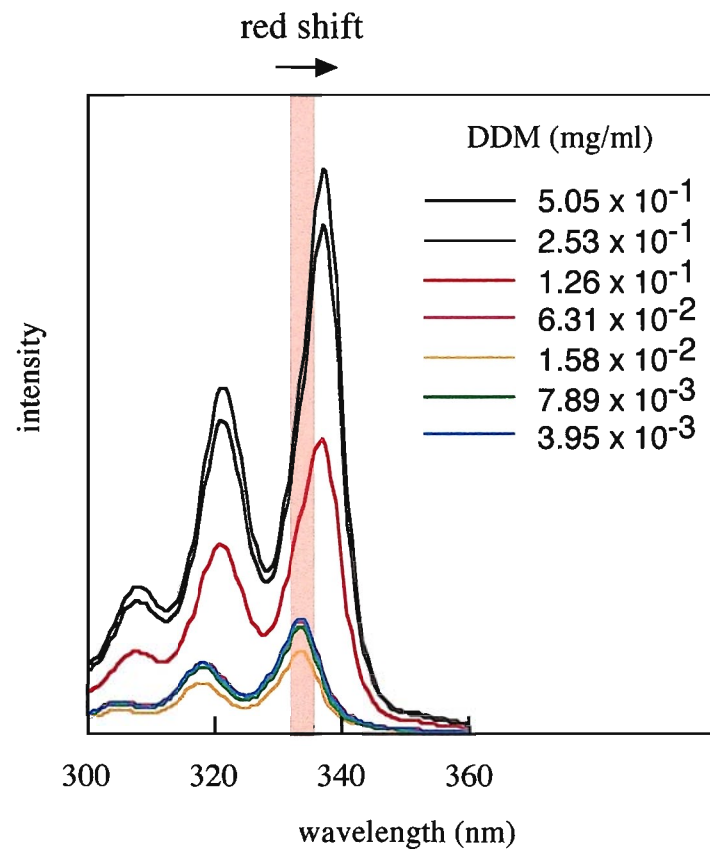


Figure 4-4 Excitation spectra of pyrene as a function of DDM concentration in aqueous solutions. Emission wavelength is 390 nm.

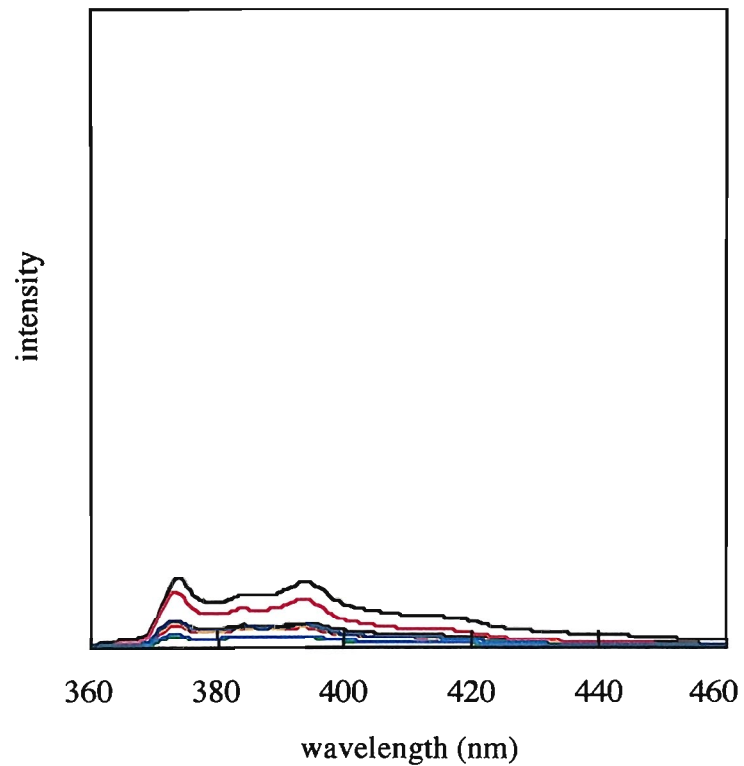


Figure 4-5 Fluorescence spectra of pyrene as a function of poly(CMU) concentration in aqueous solutions. Excitation wavelength is 339 nm.

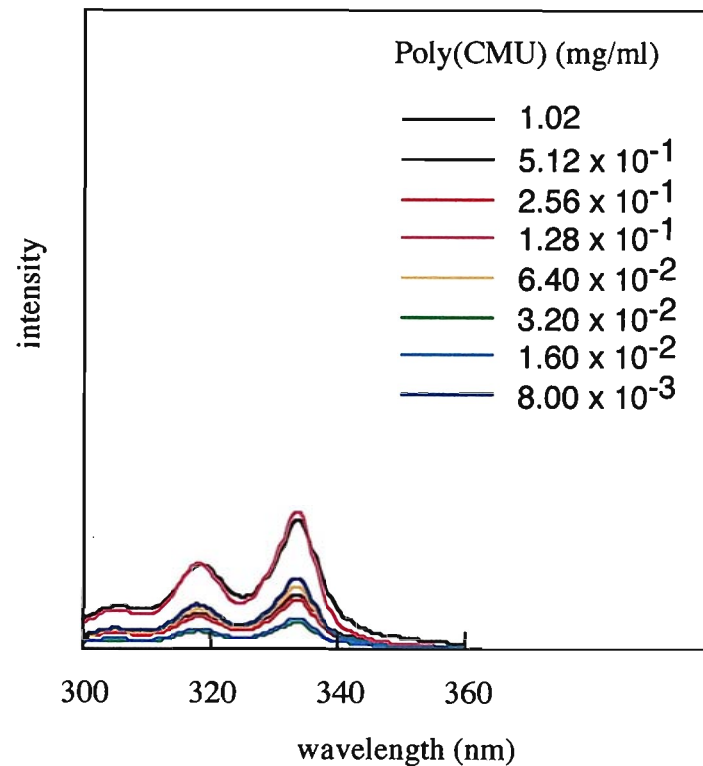


Figure 4-6 Excitation spectra of pyrene as a function of poly(CMU) concentration in aqueous solutions. Emission wavelength is 390 nm.

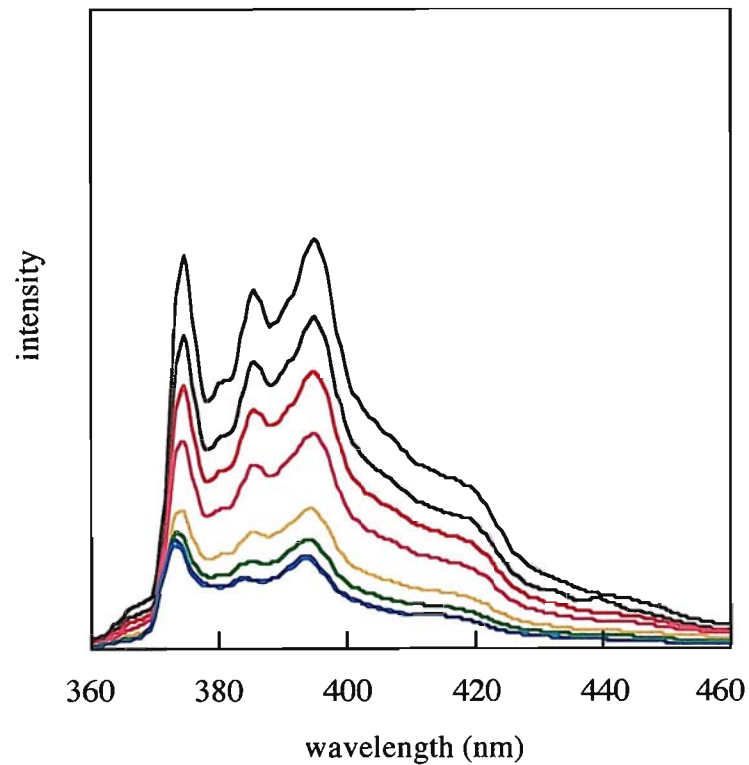


Figure 4-7 Fluorescence spectra of pyrene as a function of C_{18} -(CMU) $_{5.9}$ concentration in aqueous solutions. Excitation wavelength is 339 nm.

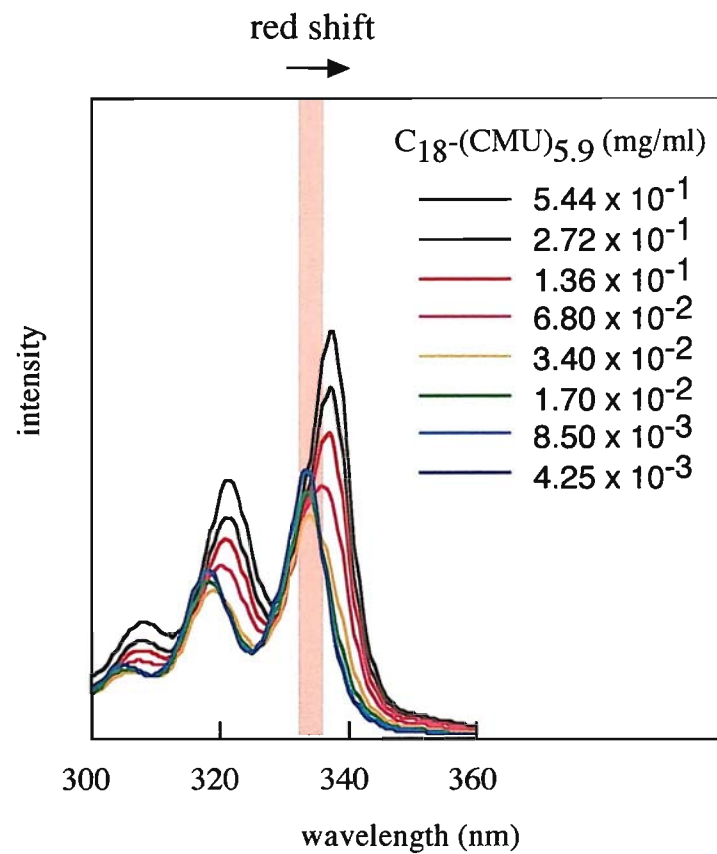


Figure 4-8 Excitation spectra of pyrene as a function of C_{18} -(CMU) $_{5.9}$ concentration in aqueous solutions. Emission wavelength is 390 nm.

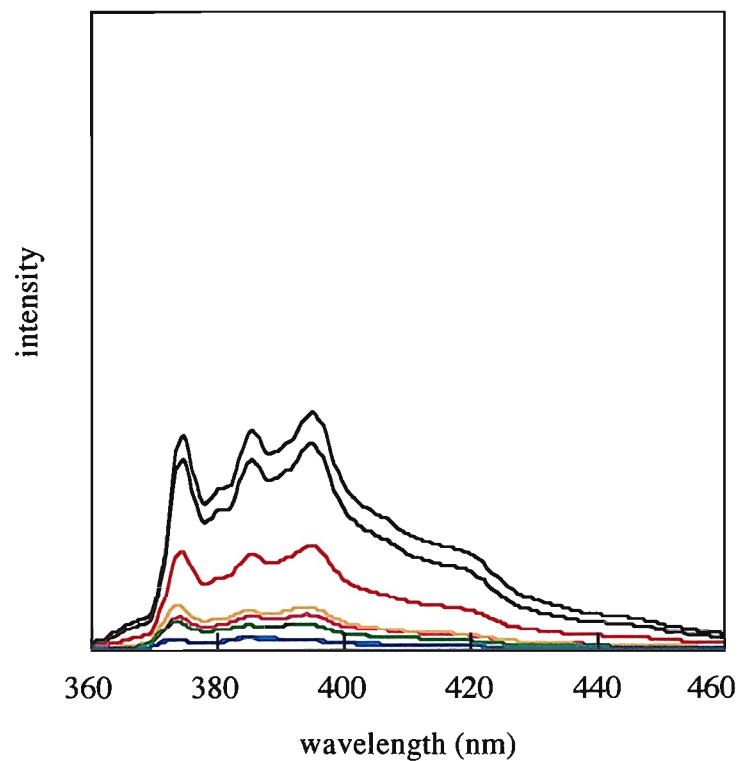


Figure 4-11 Fluorescence spectra of pyrene as a function of C_{18} -poly(CMU) concentration in aqueous solutions. Excitation wavelength is 339 nm.

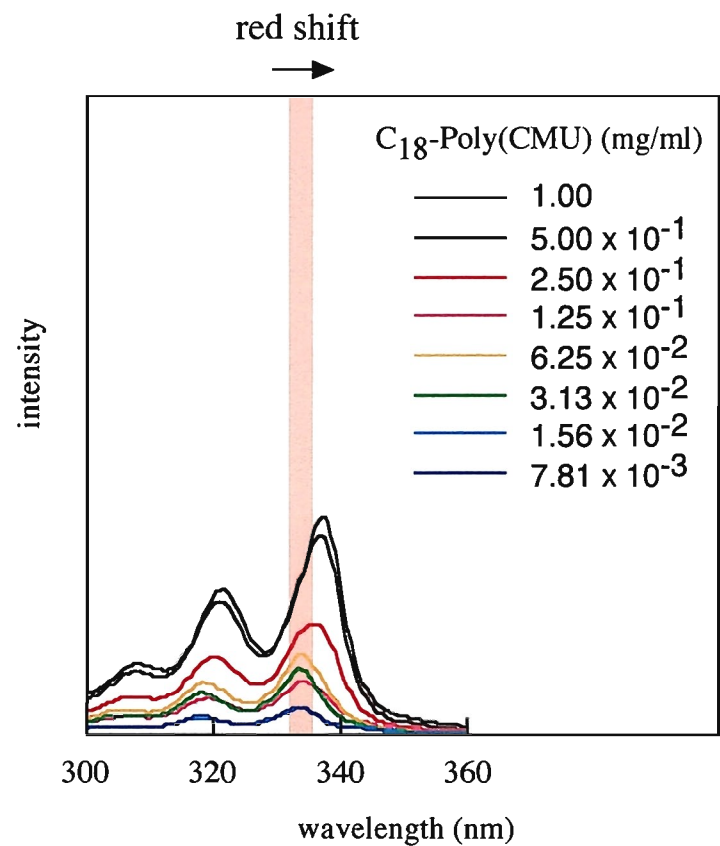


Figure 4-12 Excitation spectra of pyrene as a function of C_{18} -poly(CMU) concentration in aqueous solutions. Emission wavelength is 390 nm.

3-4 透過型電子顕微鏡による集合形態の直接観察

3-4-1 ポリマー溶液の調製と観察サンプルの作成

2章で調製した C_{18} -(CMU)_{5,9}, C_{18} -poly(CMU)よりそれぞれ 1.0 mg / ml の水溶液を調製し、この溶液を支持膜作成後カーボン蒸着、イオンコーティング処理した銅メッシュにマイクロピペットを用い微量を滴下した。所定時間後、ろ紙を用いて水分を吸い取り乾燥後に 2.0 w% モリブデン酸アンモニウム水溶液を銅メッシュ上に滴下し乾燥させ観察サンプルとした。集合形態の直接観察には透過型電子顕微鏡を用いた。

4-4-2 透過型電子顕微鏡観察

得られた透過型電子顕微鏡写真を Figure 4-11, 4-12 に示す。いずれにおいても、20 ~ 50 nm 程度の大きさを有する球状の会合体と思われる像が観察された。

3-5 動的光散乱法による分子サイズ測定

3-5-1 動的光散乱法

動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering, DLS) は、溶液中でブラウン運動している粒子 (分子会合体) の拡散移動係数を測定する方法である。そのような粒子に単色光が散乱されると、散乱光は、個々の粒子の挙動にしたがって強度のゆらぎを起こす。その減衰の様子を自己相関関数分析することにより、粒子の溶液中における挙動を定量的に知ることができるのである。その挙動が単一の分子種によるものであると考えられる場合には移動拡散係数を実験的に得ることができ、これより、分子の大きさあるいは、分子量などを推定することができる。

3-5-2 実験及び結果, 考察

2章で調製した C_{18} -(CMU)_{5,9}, C_{18} -poly(CMU)よりそれぞれ 1.0 mg / ml の水溶液を調製し、これを測定サンプルとした。得られた結果を Figure 4-13 に示す。 C_{18} -(CMU)_{5,9} は 300 ~ 400 nm 程度の大きな会合体を形成していることが確認された。この結果は TEM 観察によって得られた結果と異なる。TEM 観察におけるサンプル作成時、溶液の乾燥過程が粒子の凝集を引き起こしていることが考えられる。それに対し、 C_{18} -poly(CMU)は 10 nm 程度の会合体を形成していることが確認された。さらに、 C_{18} -(CMU)_{5,9} の温度依存性を調査したところ、高温になるにつれ、粒度分布が狭くなることが確認された。

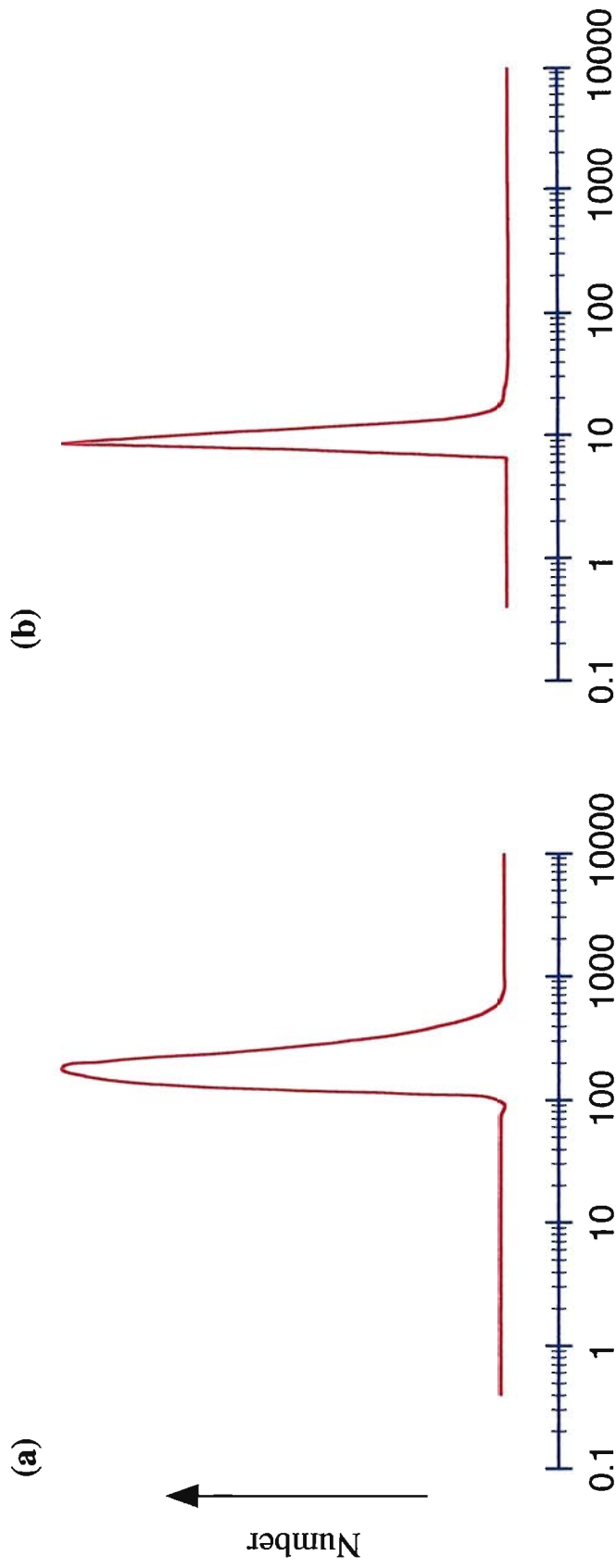


Figure 4-13 Particle size distribution of (a) C_{18} -(CMU)_{5.9} and (b) C_{18} -Poly(CMU) in water measured by dynamic light scattering.

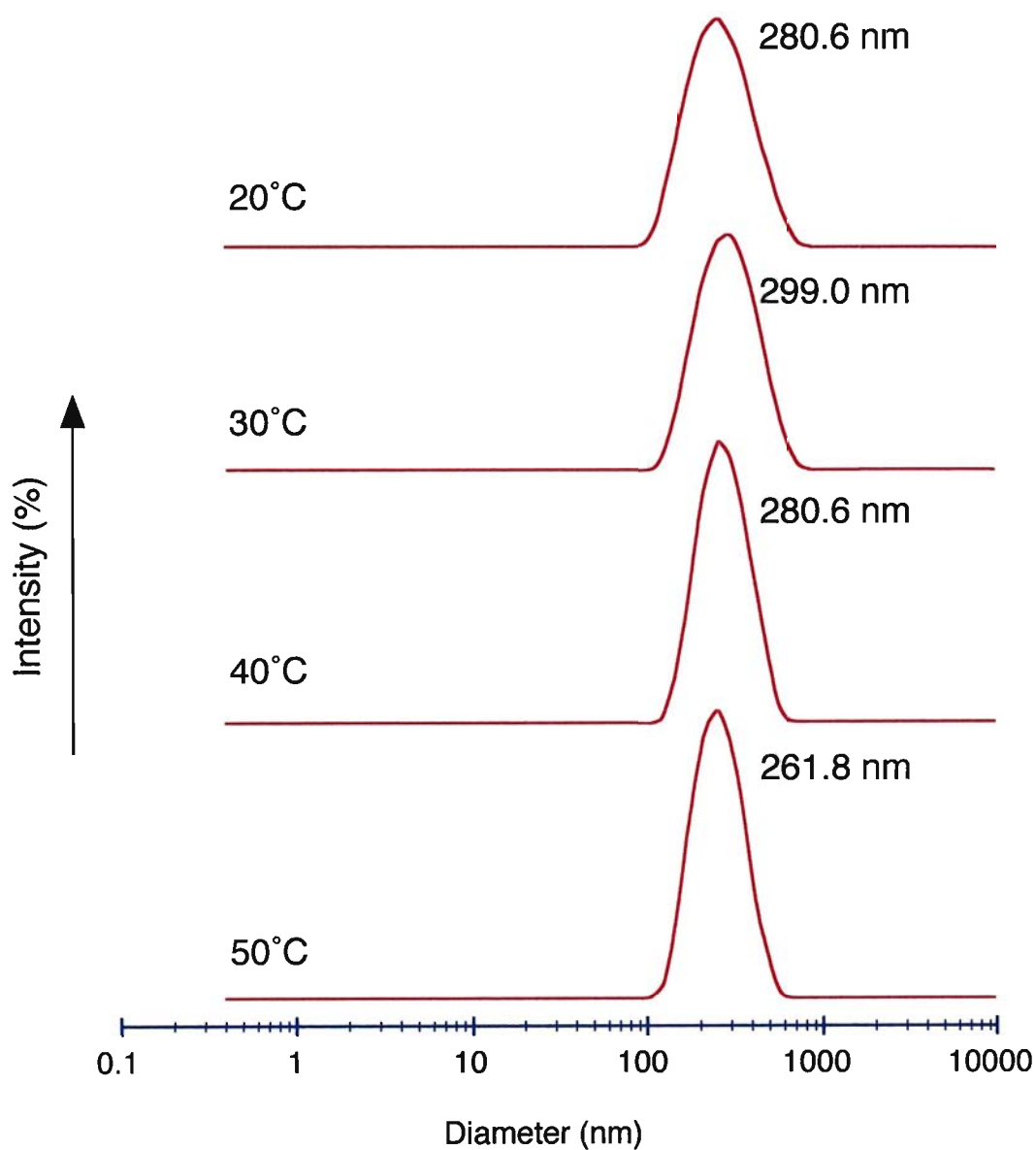


Figure 4-15 Particle size distribution of C18-(CMU)5.9 in water measured by dynamic light scattering.

4-6 SEC を利用した物性評価

4-6-1 はじめに

生物の細胞内に存在する糖質誘導体は、細胞相互間の識別、接着、シグナル伝達、増殖・分化などの識別機構に関与すると考えられている。Simons ら⁶⁸⁾によって、細胞膜上では、糖脂質と糖タンパク質が均一に混合した状態で存在しているのではなく、糖脂質はカベオラと呼ばれる小さな窪み構造（直径～50 nm）や、ラフトと呼ばれるコレステロールに非常に富んだドメイン構造を形成していることが示唆されて以来、生体中での糖脂質が関与する相互作用は、存在している環境や集合状態に依存することが予想されてきた。

糖質誘導体は、細菌やウイルスの受容体としても作用している。例えば、明石ら³⁰⁾は、マンノース結合性レクチンであるコンカナバリン A を用いて、ヒト免疫不全ウイルス 1 型（HIV-1, 俗称：エイズウイルス）の捕捉に成功している。HIV-1 は粒系が約 100 nm の微粒子であり、表面は gp120 といわれるマンノースを多く含む糖タンパク質で覆われている。そこで、ポリメタクリル酸マクロモノマーとスチレンのラジカル共重合により得られるポリスチレンコア-ポリメタクリル酸コロナの高分子ナノスフェア表面にコンカナバリン A を固定化することにより、捕捉できることを証明している。このような糖鎖が関与する相互作用の分子レベルでの解明は、特に医療分野において、かかせないものとなってきた。

本項では、先に調製した種々の両親媒性糖鎖高分子とマンノース結合性のレクチンであるコンカナバリン A（以後、Con A と略記）との相互作用の挙動を高速液体クロマトグラフィーを用いて検討した。

4-6-2 SEC 分析

溶離液には Con A の活性を維持するために、50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ 水溶液を用いた。それぞれのポリマーをこの溶液で 0.1mg/ml に調製し、測定サンプルとした。同様に Con A もこの溶液で 0.1mg/ml に調製し、測定サンプルとした。さらに、ポリマーと Con A がそれぞれ 0.1mg/ml になるように混合した溶液を調製し、測定サンプルとした。カラムには水系の SEC カラムである OHPak SB-806M HQ を用いた。Figure 4-2 に Con A（分子量：約 1.0×10^6 ）、Shodex STANDARD p-800（分子量：78.8 $\times 10^4$ の pullulan）、さらに、混合溶液のクロマトグラムを示す。Con A は分子量が 1.0×10^6 程度あるにも関わらず、溶出時間が pullulan よりも遅れている。これは、Con A が疎水性たんぱく質であるため、疎水吸着によるものと思われる。さらに、Con A と pullulan を混合した溶液の場合、Con A のピークが消失している。RI 検出器では確認できなか

ったが、UV 検出器では 25 分あたりから、およそ 1 時間程度ブロードなピークが確認された。Con A と pullulan が相互作用して生じた複合体が、疎水吸着により、遅く溶出していると考えられる。Figure 4-14, 4-15 には先に調製した C_{18} -(CMU)_{5.9}, Con A と C_{18} -(CMU)_{5.9} の混合溶液, C_{18} -poly(CMU), Con A と C_{18} -poly(CMU) の混合溶液のクロマトグラムをそれぞれ示す。どちらも構成単位がセロピオースであることから、本来、Con A と結合する部位は持たず、疎水効果による複合体形成能の調査を行った。ただし、いずれの場合も疎水吸着による溶出時間の遅れにより、溶出時間が Con A と重なり明確な知見は得られなかった。そこで、poly(2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose) (以後、poly(maltose)と略記) と混合させた溶液のクロマトグラムを Figure 4-16 に示す。poly(maltose)と Con A の混合溶液は白濁したため、0.45 mm の ADVANTEC 製ディスクフィルターでろ過をし、測定した。10 分から 20 分にかけて溶出している poly(maltose)のピークが Con A と混合ささることによって、ピーク面積が減少していることが確認される。さらに、23 分あたりに Con A とは別のピークが出現している。Con A と poly(maltose)が相互作用して出来た巨大な複合体が、疎水効果により遅く溶出した結果、屈折率強度に違いが生じ、Con A のピークよりも大きく出現していると予想される。この結果はプルランやでんぷんでは確認されなかったことから、クラスター効果による糖鎖密度の増大に起因するものと思われる。さらに、poly(maltose)に疎水基を導入した C_{18} -poly(maltose) 混合させた溶液のクロマトグラムを Figure 4-17 に示す。 C_{18} -poly(maltose)水溶液は白濁したため、0.45 μ m ディスクフィルターでろ過をした。 C_{18} -poly(maltose)のピークも疎水吸着により溶出が遅れているものの、Con A と混合した場合、poly(maltose)で得られた結果と同様に、新たなピークが確認された。ただし、疎水基の導入によって新たな効果が発現されているかを確認することは出来なかった。測定方法として、溶離液の塩の選択、あるいは、それぞれの糖をカラムに担持して Con A の溶出挙動を比較するなどすると、明確な結果が得られるのではないかと期待出来る。

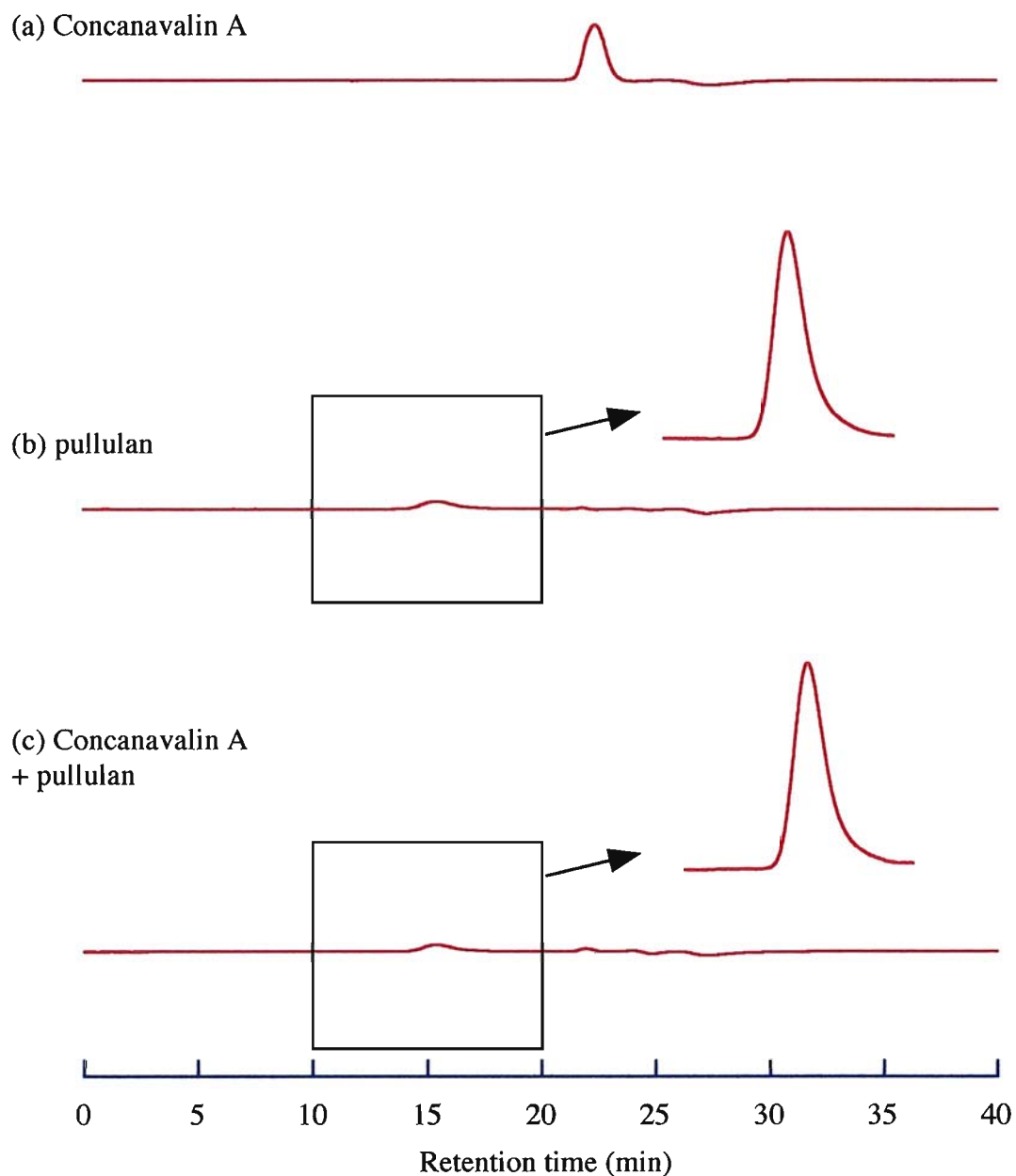


Figure 4-16 Chromatograms of (a) Concanavalin A and (b) pullulan and (c) Concanavalin + pullulan with OHPak SB-806 M HQ (8.0 mm I.D. x 300 mm) at 20°C. Eluent: 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ aq., flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.

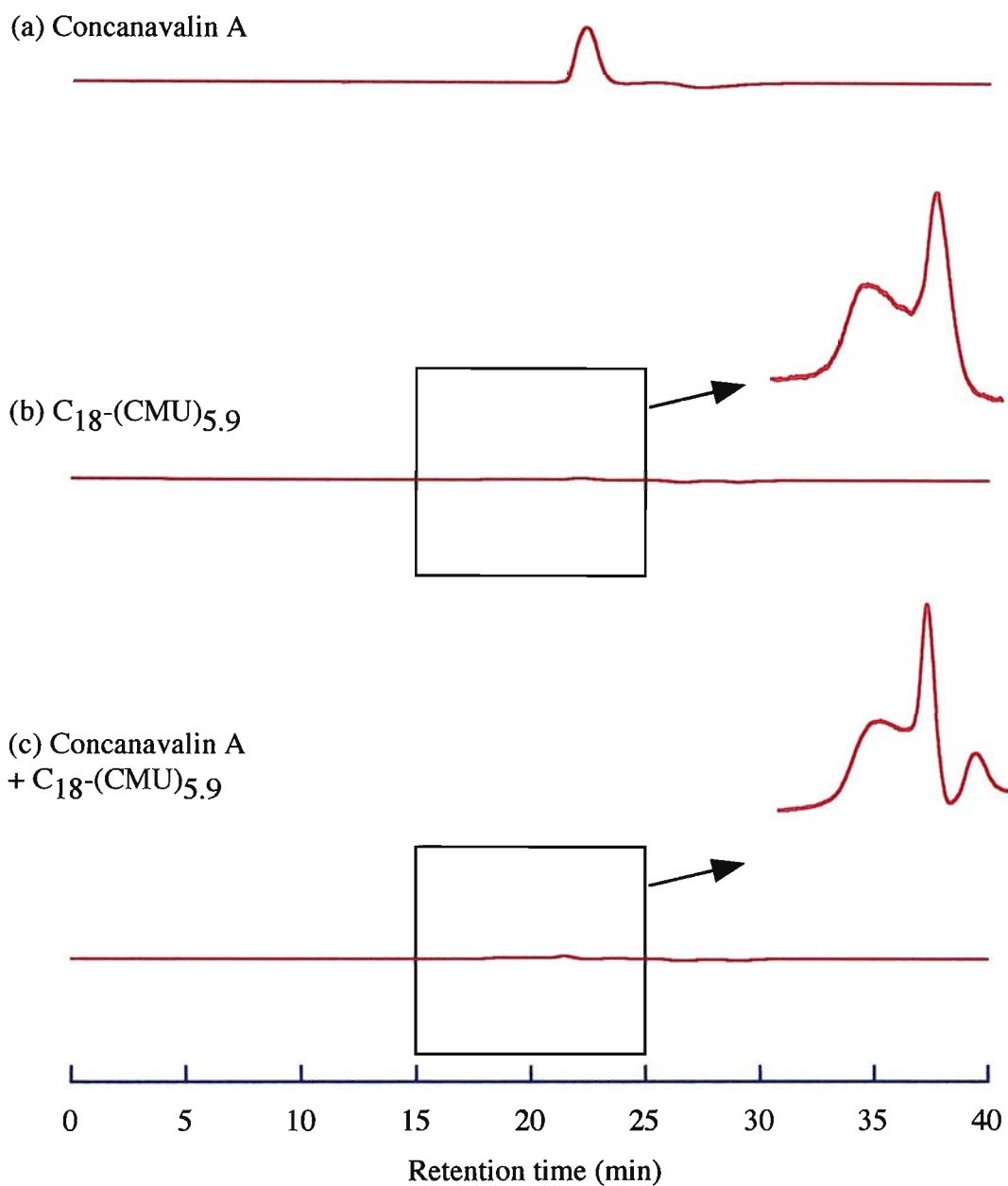


Figure 4-17 Chromatograms of (a) Concanavalin A and (b) C_{18} -(CMU)_{5.9} and (c) Concanavalin + C_{18} -(CMU)_{5.9} with OHPak SB-806 M HQ (8.0 mm I.D. x 300 mm) at 20°C. Eluent: 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ aq., flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.

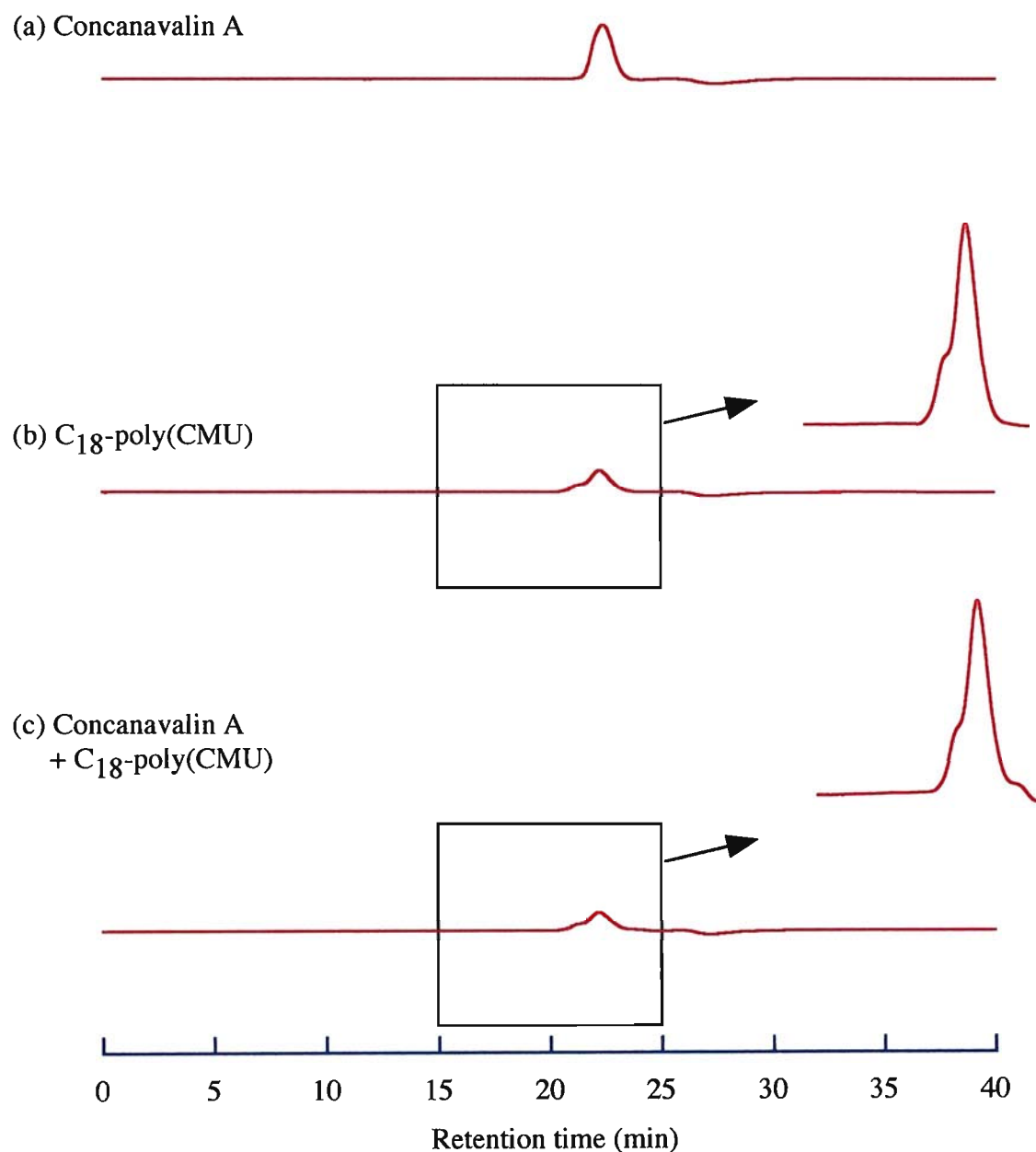


Figure 4-18 Chromatograms of (a) Concanavalin A and (b) C₁₈-poly(CMU) and (c) Concanavalin + C₁₈-poly(CMU) with OHpak SB-806 M HQ (8.0 mm I.D. x 300 mm) at 20°C. Eluent: 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ aq., flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.

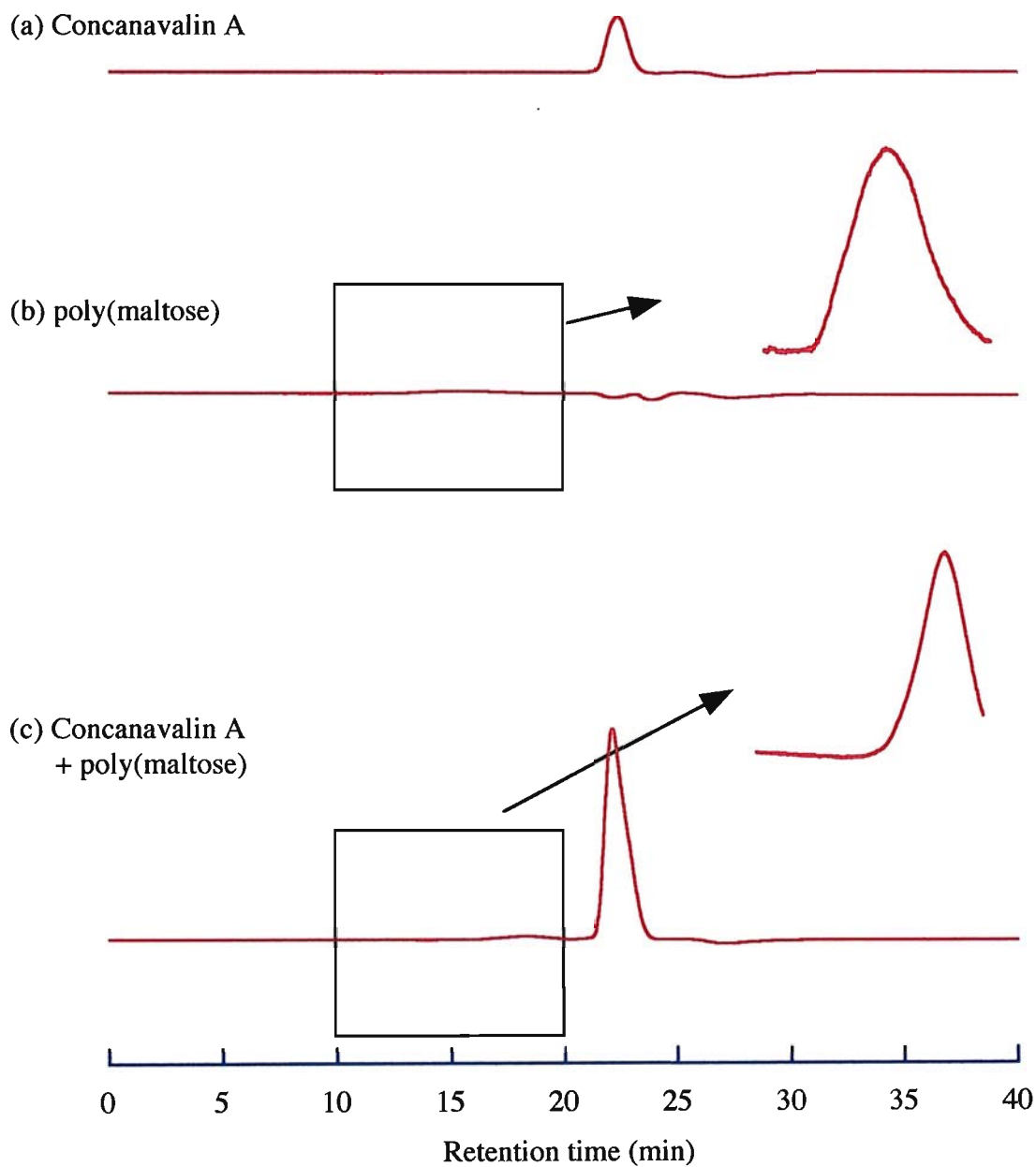


Figure 4-19 Chromatograms of (a) Concanavalin A and (b) poly(maltose) and (c) Concanavalin + poly(maltose) with OHpak SB-806 M HQ (8.0 mm I.D. x 300 mm) at 20°C. Eluent: 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ aq., flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.

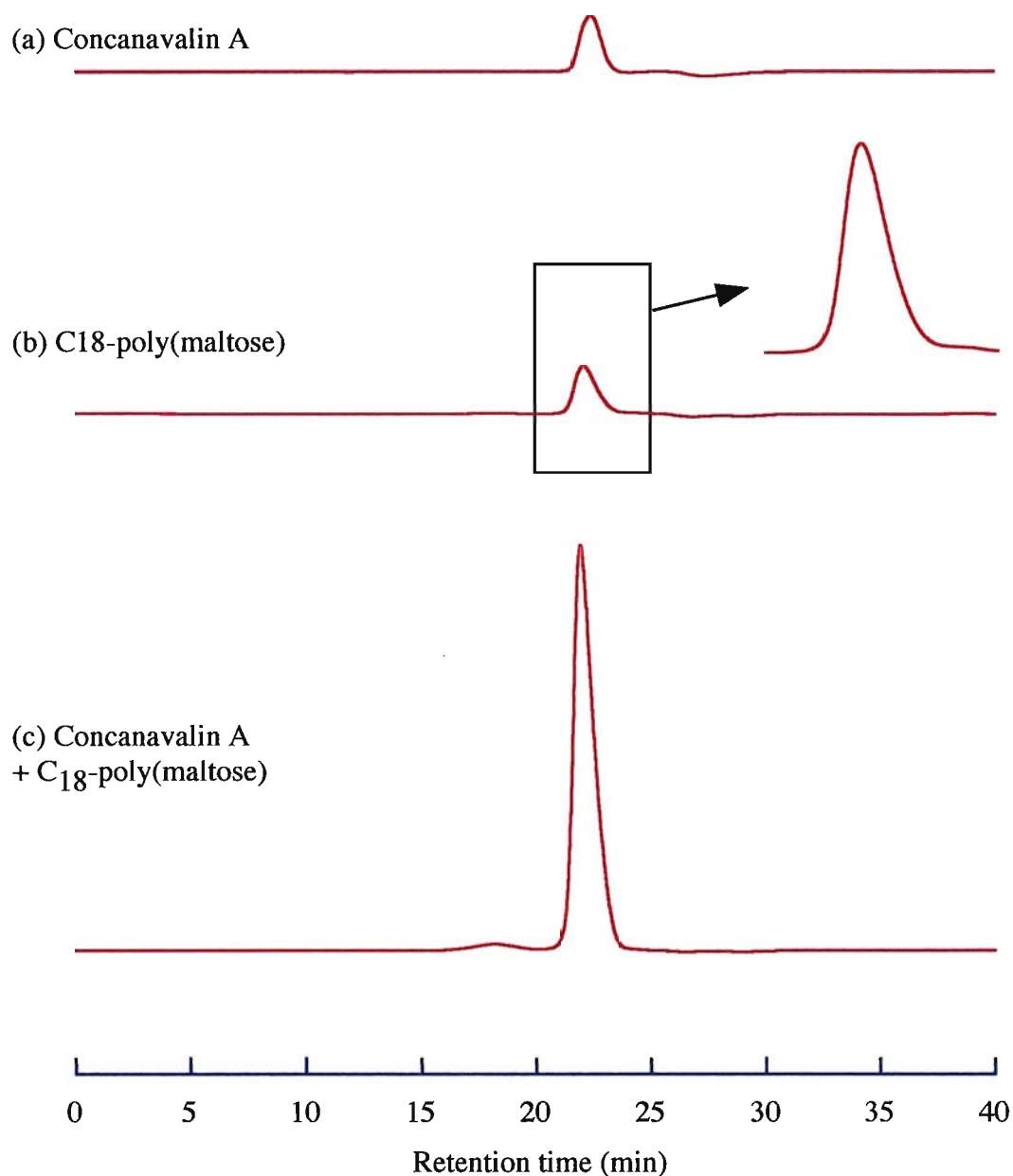


Figure 4-20 Chromatograms of (a) Concanavalin A and (b) C₁₈-poly(maltose) and (c) Concanavalin + C₁₈-poly(maltose) with OHPak SB-806 M HQ (8.0 mm I.D. x 300 mm) at 20°C. Eluent: 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ aq., flow rate: 0.5 ml/min, RI detection.

第五章

オリゴ糖ポリマーの機能材料への応用

5-1 はじめに

現在、全世界で年間約 1.5 億トンもの合成高分子が石油から合成され、ほとんどが大量廃棄されている。持続可能社会の実現に向かって、材料開発においても、高性能化に加え環境への負荷を最小にしようとする糖、アミノ酸、タンパク質等の天然に存在する素材を用いた高分子材料設計の重要性が高まっている。これまでに、セルロース等の多糖類やペプチド、脂質、アミノ酸などのバイオマテリアルを利用したナノ材料や医療材料等を開発してきた。最近の研究により、天然に存在する素材の1つである『糖』は生体内の活性発現の調節因子として、重要な機能を担っていることが解明され、その機能を越える糖鎖複合体を創製し機能材料へ展開する機運が高まっている。従って、糖鎖を化学修飾する技術、さらにそれらを機能性材料として再構築する技術の確立は重要な課題である。

本章では、先に合成したオリゴ糖側鎖型高分子を様々な用途への応用を検討した。

5-2 糖認識タンパク質吸着剤への応用

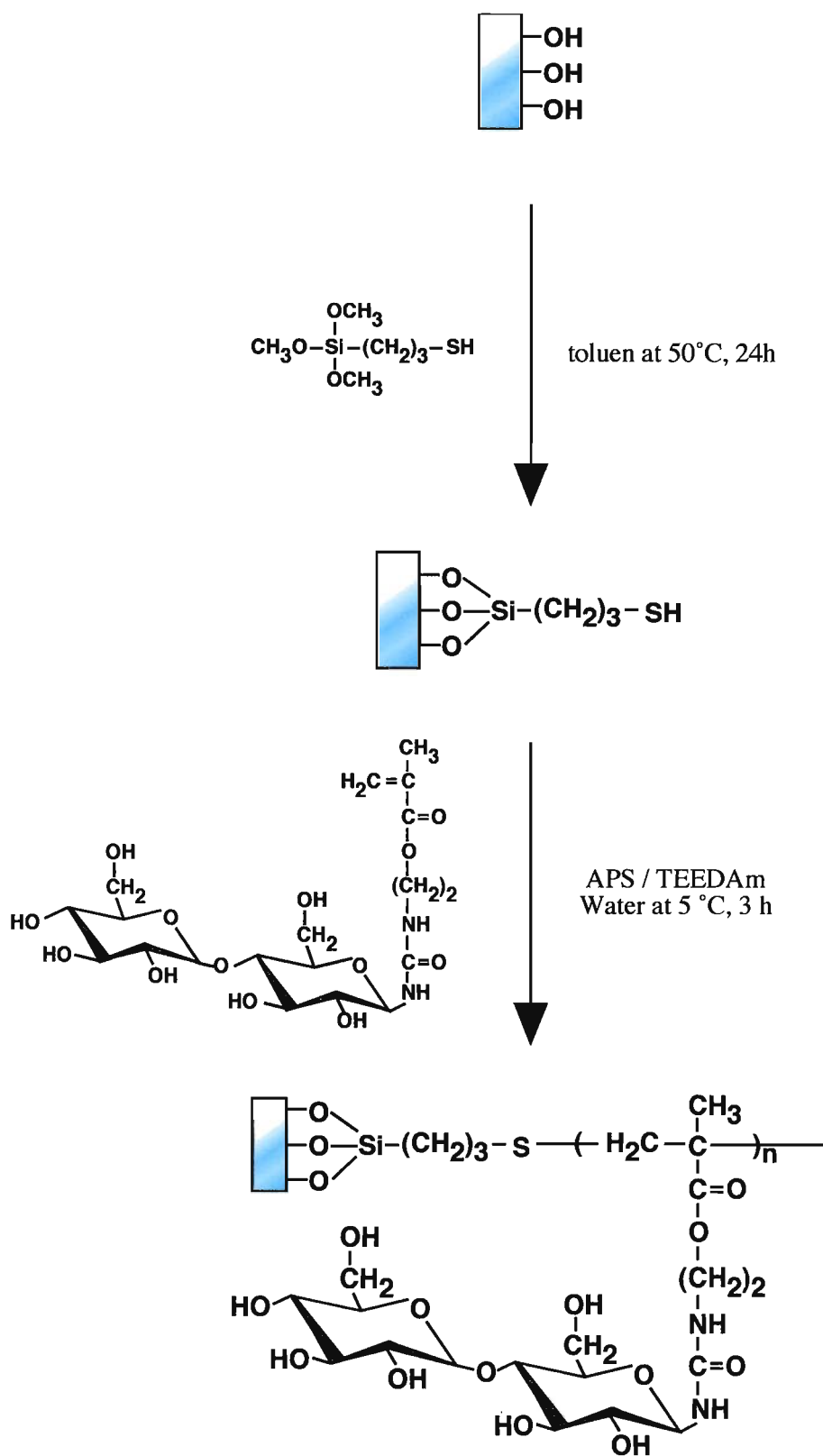
本項では、既存の方法で合成した poly (2-(methacryloyloxy) ethylureido maltose) の maltose 側鎖におけるタンパク質認識能を、レクチンの結合挙動により調査し、さらにアフィニティ型レクチン分離剤としての応用を目指し、シリカゲルおよびセルロースビーズに持たせた Sil-2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose (以降 Sil-Mal_n)、Cel-2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose (以降 Cel-Mal_n) とレクチンの結合挙動を調査することを目的とした。前章において、合成したオリゴ糖側鎖型高分子の糖側鎖に生理活性が保持されていることを確認した。そこで、本項では、このオリゴ糖側鎖型高分子を担体や架橋ゲルに固定化することにより、アフィニティ型分離剤としての応用を検討した。既報に従い、シリカゲル及びセルロースビーズにSH基を導入し、次いで、ラジカル重合により、2-(methacryloyloxy)ethylureido maltoseとのテロメリゼーションを行った (Scheme 5-1)。また、2-(methacryloyloxy)ethylureido maltoseをメチレンビスアクリルアミドにより架橋し、共重合ゲルを調製した (Scheme 5-2)。

本章で用いた主な試薬及び溶媒を Table 4-1 に示す。また、使用した分析機器を以下に示す。

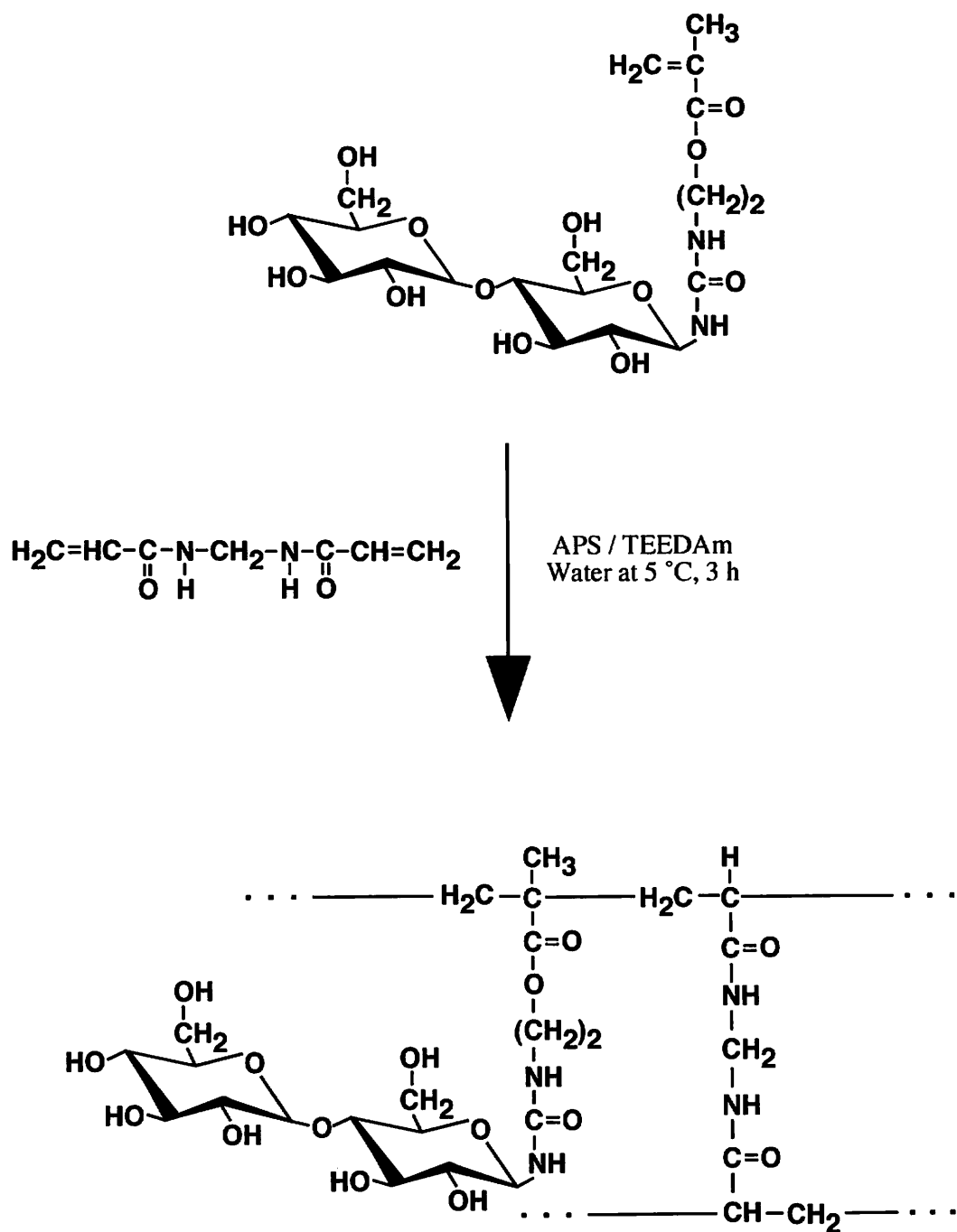
Table 4-1 本章で用いた主な試薬及び溶媒

試薬名	会社名	カタログNo.
シリカゲル	YMC CO., LTD.	
トルエン	和光純薬工業 (株)	201-01871
3-mercaptopropyl trimethoxy silan	(株) チッソ	
ジエチルエーテル	和光純薬工業 (株)	055-01155
ポリアクリル酸ナトリウム (アクアリック DL-522)	日本触媒 (株)	4L13-223
水酸化ナトリウム	和光純薬工業 (株)	193-02127
炭酸カルシウム	奥多摩工業 (株)	TP-221GS
ビスコース	レンゴー (株)	
塩酸	和光純薬工業 (株)	080-01066
2,2'dithiopyridine	関東化学 (株)	218-343-1
1-dodecanthiol	和光純薬工業 (株)	126-02752
メタノール	和光純薬工業 (株)	132-06471
テトラエチルエチレンジアミン	関東化学 (株)	40762-41
ペルオキシニ硫酸アンモニウム	和光純薬工業 (株)	018-03282

紫外可視分光光度計 : JASCO V-560 UV/VIS Spectrophotometer



Scheme 5-1 Synthesis scheme of Sil-2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose and Cel-2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose



Scheme 5-2 Copolymerization of 2-(methacryloyloxy)ethylureido maltose

5-2-1 Sil-MPS の調製

脱水トルエン 90 ml に silica gel 5.0 g を加え, 30 分外部超音波照射を行い, silica gel を分散させた。その後, 3-mercaptopropyl trimethoxy silan 7.24 g (36.88 mmol) を加えて 200 rpm, 50 °C で 24 時間かき混ぜた。その後, 放冷し G5 ガラスフィルターでろ過し, トルエンで洗浄したのち, ジエチルエーテルで洗浄し, 減圧乾燥後白色固体を得た。この白色固体の元素分析値を Table 4-2 に示す。

Table 4-2 Elemental analysis of Sil-MPS

	H (%)	C (%)	S (%)
Found	1.37	3.87	2.51

元素分析の結果から, 炭素含量, 硫黄含量の増加が確認された。また, 元素分析の結果から, MPS の固定化量は 8.093 % と算出された。算出式を以下に示す。

$$\text{固定化量 (w\%)} = \frac{\text{Sil-MPSの硫黄含量} \times \text{MPSの分子量}}{\text{硫黄の分子量} \times \text{MPSの硫黄数}}$$

5-2-2 Cel-MPS の調製

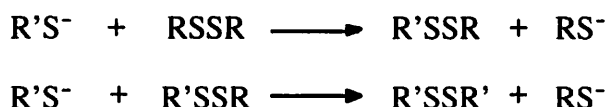
ビスコース相分離法を利用してセルロースマイクロビーズを調製した。ポリアクリル酸ナトリウム 400 g を純水 800 g に加え, それに 330 g/l 水酸化ナトリウム水溶液 48 g, 炭酸カルシウム 80 g を混合させた。さらに, ビスコース 250 g を加えて 120 rpm で 15 分間かき混ぜ, その後, 湯浴を 80 °C まで昇温し, 80 °C で 30 分間かき混ぜ, 遠心分離により上澄みを除去した。44m メッシュでろ過し純水で洗浄したのち, 5 % 塩酸水溶液 1 l を加えて 1 時間かき混ぜ, G5 ガラスフィルターでろ過を行い, 純水で洗浄したのち熱湯で洗浄を行った。セルロースビーズ 23.81 g をメタノールで洗浄したのち, トルエンで洗浄し, 減圧乾燥後に白色固体を得た。そのうち 4 g を採取し脱水トルエン 90 ml を加え, 30 分外部超音波照射を行い, セルロースビーズを分散させた。その後, 3-mercaptopropyl trimethoxy silan 7.24 g (36.88 mmol) を加えて 200 rpm, 50 °C で 24 時間かき混ぜた。その後, 放冷し G5 ガラスフィルターでろ過し, トルエンで洗浄したのち, ジエチルエーテルで洗浄し, 減圧乾燥後白色固体を得た。この白色固体の元素分析値を Table 4-3 に示す。

Table 4-3 Elemental analysis of Cell-MPS

	H (%)	C (%)	S (%)
Found	6.66	41.2	2.18

5-2-3 チオール-ジスルフィド交換反応を利用した固定化量調査

SH基を有する化合物にSS化合物を混合すると、アルカリ性下でScheme 4-4のような交換反応を行う。その反応速度はRSHよりもRS⁻の濃度に依存し、pHがpK_{SH}より低いときは反応速度が低下するため、主に定量反応は弱アルカリ性で進められる。RSHは混合ジスルフィドとして、ピリジン誘導体に結合し、反応が進むと、さらに混合ジスルフィドがRSHと反応してRSSRを生成するが、どの反応段階においてもSH基と当量のRS⁻が生成し、SH基の定量が可能である。今回用いた2, 2'-dithiopyridine (2PDS)は、この交換反応により2-Thiopyridone(2TP)を生成し、この生成物が持つ吸光係数を利用して定量を行い、シリカゲルとセルロースビーズへのSH基の固定化量を算出した。

**Scheme 4-4** Thiol-disulfide interchange

5-2-4 検量線作成

2, 2'-dithiopyridine (2PDS) 6.71 mg をメタノール 100 ml に溶解し 2×10^{-4} M 2PDS 溶液を調製した。それから 5 ml を採取しメタノール 10 ml を加えて 1×10^{-4} M 2PDS 溶液を調整し、同様に 5×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , 12.5×10^{-5} M 2PDS 溶液を調製した。さらに、1-dodecanthiol 7.2 ml とメタノール 25 ml とを混合した溶液を調製し、それから 1 ml 採取し各種濃度の 2PDS 溶液 2 ml に加え、8 時間攪拌し UV スペクトル測定を行った。UV スペクトルは Figure 4-1 に示し、検量線より $y = 0.5968x + 0.0202$ の式を算出した。

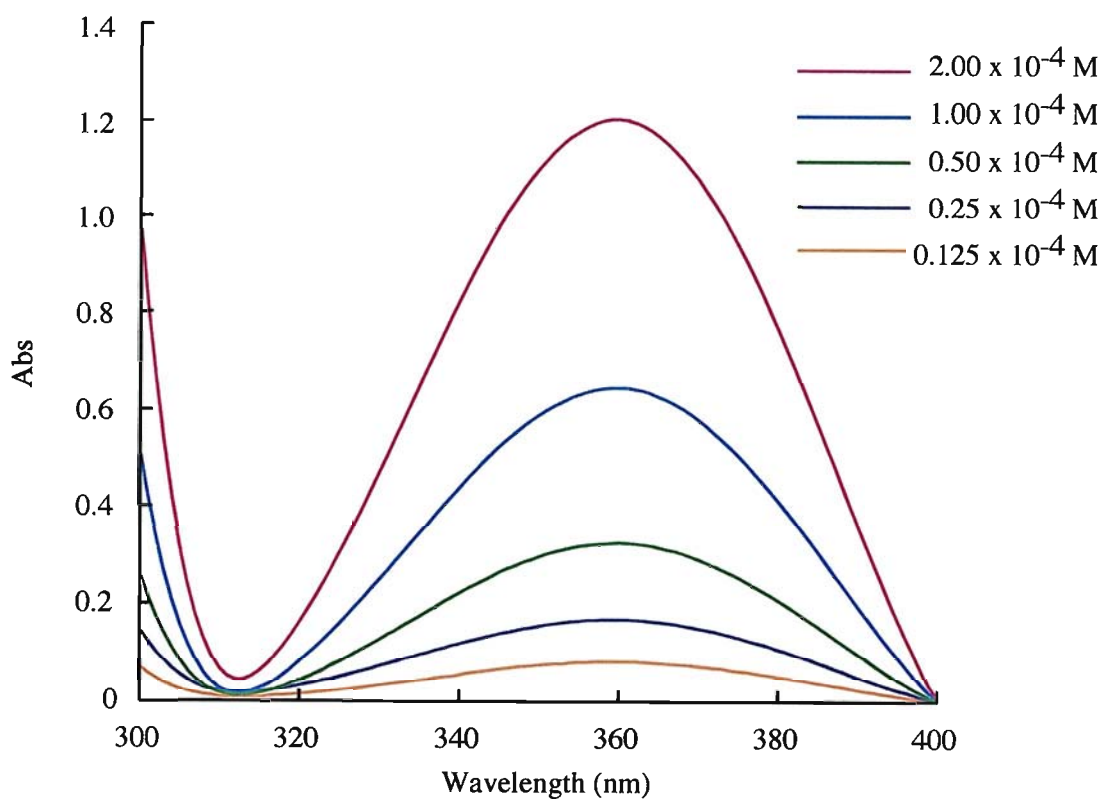


Figure 5-1 Absorption spectra of 2PDS and 2TP in MeOH solution.

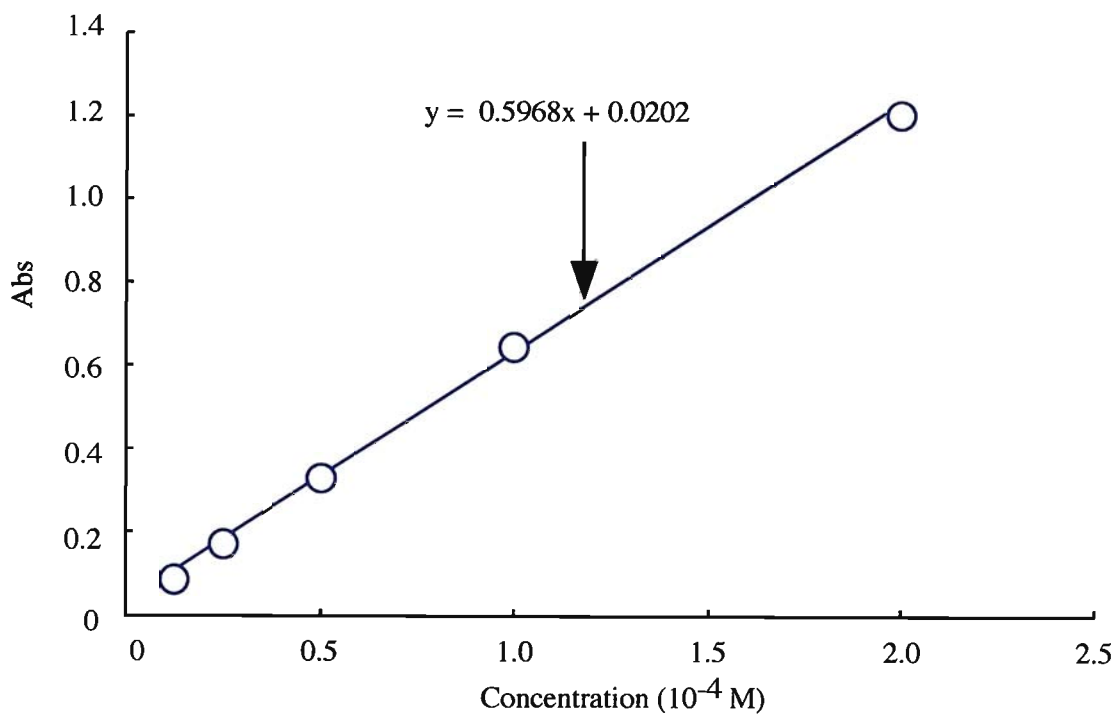


Figure 5-2 Concentration dependence of UV absorbance with 2TP in MeOH solution at 360 nm.

5-2-5 固定化量算出

2PDS 8.43 mg をメタノール 250ml に溶解させ、採取した Sil-MPS 3.5 mg, Cell-MPS 3.5 mg に 10 ml ずつ加え、外部超音波照射を 30 分行った。その後 8 時間攪拌したのち、UV スペクトル測定を行った。360 nm における吸光度は Sil-MPS が 0.266, Cell-MPS が 0.212 であった。その結果を検量線に代入し、Sil-MPS 及び Cell-MPS の固定化量は 5.87×10^{-4} mol/g, 4.59×10^{-4} mol/g と算出した。

5-2-6 マルトースマクロマーグラフト化シリカの調製

Sil-Mal₅ の調製

十分に脱気した蒸留水 9 ml に Sil-MPS 0.05 g (0.0392 mmol) とマルトースビニルモノマー 0.109 g (純度 89.4%, 0.196 mmol, MPS 残基に対して約 5 倍当量) を加え、15 分間外部超音波照射を行い Sil-MPS を分散させ、5°C で窒素通気を 30 分間行った。その後、N,N,N',N'-tetraethylethyldiamine (TEEDAm) を 0.084 ml 加え、開始剤として ammonium persulfate (APS) を 8.95 mg (0.0392 mmol) 加えて、5°C 窒素雰囲気下で 3 時間かき混ぜた。その後、G5 ガラスフィルターでろ過し、蒸留水でよく洗浄したのちエタノール、ジエチルエーテルの順でさらに洗浄し、減圧乾燥により白色固体 40.7 mg を得た。この白色固体の元素分析値を Table 4-4 に示す。

Table 4-4 Elemental analysis of Sil-Mal₅

	H (%)	C (%)	N (%)	C/N
Found	1.50	6.50	0.64	10.2

Sil-Mal₁₀ の調製

十分に脱気した蒸留水 9 ml に Sil-MPS 0.05 g (0.0392 mmol) とマルトースビニルモノマー 0.218 g (純度 89.4%, 0.392 mmol, MPS 残基に対して約 10 倍当量) を加え、15 分間外部超音波照射を行い Sil-MPS を分散させ、5°C で窒素通気を 30 分間行った。その後、N,N,N',N'-tetraethylethyldiamine (TEEDAm) を 0.084 ml 加え、開始剤として ammonium persulfate (APS) を 8.95 mg (0.0392 mmol) 加えて、5°C 窒素雰囲気下で 3 時間かき混ぜた。その後、G5 ガラスフィルターでろ過し、蒸留水でよく洗浄したのちエタノール、ジエチルエーテルの順でさらに洗浄し、減圧乾燥により白色固体 48.5 mg を得た。この白色固体の元素分析値を Table 4-5 に示す。

Table 4-5 Elemental analysis of Sil-Mal₁₀

	H (%)	C (%)	N (%)	C/N
Found	1.47	6.61	0.65	10.2

Sil-Mal₂₀ の調製

十分に脱気した蒸留水 13 ml に Sil-MPS 0.08 g (0.0627 mmol) とマルトースビニルモノマー 0.958 g (純度 65.0%, 1.25 mmol, MPS 残基に対して約 20 倍当量) を加え, 15 分間外部超音波照射を行い Sil-MPS を分散させ, 5°C で窒素通気を 30 分間行った。その後, N,N,N',N'-tetraethylethylenediamine (TEEDAm) を 0.135 ml 加え, 開始剤として ammonium persulfate (APS) を 14.3 mg (0.0627 mmol) 加えて, 5°C 窒素雰囲気下で 3 時間かき混ぜた。その後, G5 ガラスフィルターでろ過し, 蒸留水でよく洗浄したのちエタノール, ジエチルエーテルの順でさらに洗浄し, 減圧乾燥により白色固体 70.0 mg を得た。この白色固体の元素分析値を Table 4-6 に示す。

Table 4-6 Elemental analysis of Sil-Mal₂₀

	H (%)	C (%)	N (%)	C/N
Found	1.90	9.65	1.18	8.18

Sil-Mal₃₀ の調製

十分に脱気した蒸留水 25 ml に Sil-MPS 0.08 g (0.0627 mmol) とマルトースビニルモノマー 1.56 g (純度 59.9%, 1.88 mmol, MPS 残基に対して約 30 倍当量) を加え, 15 分間外部超音波照射を行い Sil-MPS を分散させ, 5°C で窒素通気を 30 分間行った。その後, N,N,N',N'-tetraethylethylenediamine (TEEDAm) を 0.135 ml 加え, 開始剤として ammonium persulfate (APS) を 14.3 mg (0.0627 mmol) 加えて, 5°C 窒素雰囲気化で 3 時間かき混ぜた。その後, G5 ガラスフィルターでろ過し, 蒸留水でよく洗浄したのちエタノール, ジエチルエーテルの順でさらに洗浄し, 減圧乾燥により白色固体 76.4 mg を得た。この白色固体の元素分析値を Table 4-7 に示す。

Table 4-7 Elemental analysis of Sil-Mal₃₀

	H (%)	C (%)	N (%)	C/N
Found	2.34	12.3	1.41	8.71

Cell-Mal₅ の調製

十分に脱気した蒸留水 13.5 ml に Cell-MPS 0.12 g (0.0551 mmol) とマルトースビニルモノマー 0.168 g (純度 81.4 %, 0.275 mmol, MPS 残基に対して約 5 倍当量) を加え, 15 分間外部超音波照射を行い Cell-MPS を分散させ, 5°C で窒素通気を 30 分間行った。その後, N,N,N',N'-tetraethylethyldiamine (TEEDAm) を 0.119 ml 加え, 開始剤として ammonium persulfate (APS) を 12.6 mg (0.0551 mmol) 加えて, 5°C 窒素雰囲気酸化で 3 時間かき混ぜた。その後, G5 ガラスフィルターでろ過し, 蒸留水でよく洗浄したのちエタノール, ジエチルエーテルの順でさらに洗浄し, 減圧乾燥により白色固体 73.49 mg を得た。この白色固体の元素分析値を Table 4-8 に示す。

Table 4-8 Elemental analysis of Cell-Mal₅

	H (%)	C (%)	N (%)
Found	6.37	39.9	0.19

Cell-Mal₁₀ の調製

十分に脱気した蒸留水 13.5 ml に Cell-MPS 0.12 g (0.0551 mmol) とマルトースビニルモノマー 0.457 g (純度 59.89 %, 0.551 mmol, MPS 残基に対して約 10 倍当量) を加え, 15 分間外部超音波照射を行い Cell-MPS を分散させ, 5°C で窒素通気を 30 分間行った。その後, N,N,N',N'-tetraethylethyldiamine (TEEDAm) を 0.119 ml 加え, 開始剤として ammonium persulfate (APS) を 12.6 mg (0.0551 mmol) 加えて, 5°C 窒素雰囲気酸化で 3 時間かき混ぜた。その後, G5 ガラスフィルターでろ過し, 蒸留水でよく洗浄したのちエタノール, ジエチルエーテルの順でさらに洗浄し, 減圧乾燥により白色固体 75.6 mg を得た。この白色固体の元素分析値を Table 4-9 に示す。

Table 4-9 Elemental analysis of Cell-Mal₁₀

	H (%)	C (%)	N (%)
Found	6.42	40.5	0.25

Cell-Mal₂₀ の調製

十分に脱気した蒸留水 15 ml に Cell-MPS 0.12 g (0.0551 mmol) とマルトースピニルモノマー 0.914 g (純度 59.9 %, 1.10 mmol, MPS 残基に対して約 20 倍当量) を加え, 15 分間外部超音波照射を行い Cell-MPS を分散させ, 5°C で窒素通気を 30 分間行った。その後, N,N,N',N'-tetraethylethyldiamine (TEEDAm) を 0.119 ml 加え, 開始剤として ammonium persulfate (APS) を 12.6 mg (0.0551 mmol) 加えて, 5°C 窒素雰囲気酸化で 3 時間かき混ぜた。その後, G5 ガラスフィルターでろ過し, 蒸留水でよく洗浄したのちエタノール, ジエチルエーテルの順でさらに洗浄し, 減圧乾燥により白色固体 92.5 mg を得た。この白色固体の元素分析値を Table 4-10 に示す。

Table 4-10 Elemental analysis of Cell-Mal₂₀

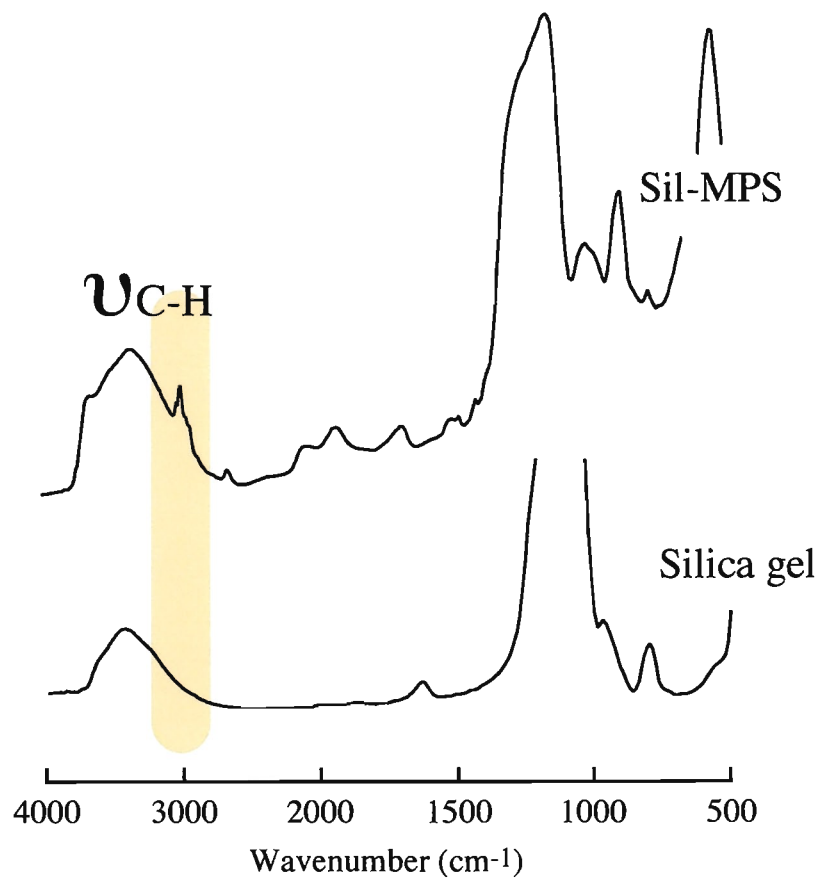
	H (%)	C (%)	N (%)
Found	6.39	39.9	0.35

Cell-Mal₃₀ の調製

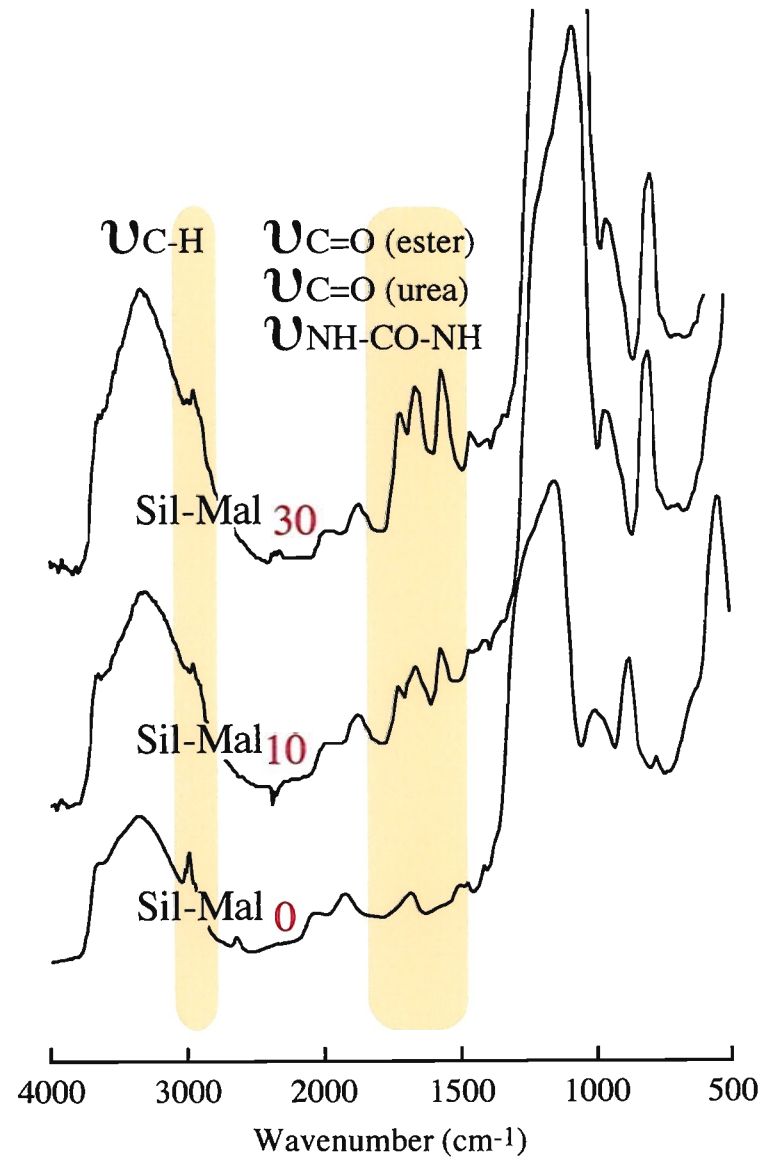
十分に脱気した蒸留水 13.5 ml に Cell-MPS 0.10 g (0.0459 mmol) とマルトースピニルモノマー 1.14 g (純度 59.86 %, 1.38 mmol, MPS 残基に対して約 30 倍当量) を加え, 15 分間外部超音波照射を行い Cell-MPS を分散させ, 5°C で窒素通気を 30 分間行った。その後, N,N,N',N'-tetraethylethyldiamine (TEEDAm) を 0.0989 ml 加え, 開始剤として ammonium persulfate (APS) を 10.5 mg (0.0459 mmol) 加えて, 5°C 窒素雰囲気酸化で 3 時間かき混ぜた。その後, G5 ガラスフィルターでろ過し, 蒸留水でよく洗浄したのちエタノール, ジエチルエーテルの順でさらに洗浄し, 減圧乾燥により白色固体 67.5 mg を得た。この白色固体の元素分析値を Table 4-11 に示す。

Table 4-11 Elemental analysis of Cell-Mal₃₀

	H (%)	C (%)	N (%)
Found	6.34	40.4	0.42



Diffuse reflection FT-IR spectrum of (a) silica gel and (b) Sil-MPS.



Diffuse reflection FT-IR spectrum of obtained Sil-Mal_n (n = 0, 10, 30)

5-2-7 メチレンビスアクリルアミド架橋ゲルの調製

[maltose monomer]/[MBAAm] = 8/2

十分に脱気した蒸留水 2.2 ml にマルトースビニルモノマー 0.614 g (純度 81.42 %, 1.01 mmol) を溶解させ、それに methylenebisacrylamide (MBAAm) を 38.8 mg (0.252 mmol) 加えて 5°C で窒素通気を 30 分間行った。その後、N,N,N',N'-tetraethylethyldiamine (TEEDAm) を 0.0217 ml 加え、開始剤として ammonium persulfate (APS) を 2.3 mg (0.0101 mmol) 加えて、5°C 窒素雰囲気化で 3 時間かき混ぜた。その後、蒸留水でよく洗浄したのち凍結乾燥により白色固体を得た。

[maltose monomer]/[MBAAm] = 7/3

十分に脱気した蒸留水 2.2 ml にマルトースビニルモノマー 0.614 g (純度 81.42 %, 1.01 mmol) を溶解させ、それに methylenebisacrylamide (MBAAm) を 66.5 mg (0.432 mmol) 加えて 5°C で窒素通気を 30 分間行った。その後、N,N,N',N'-tetraethylethyldiamine (TEEDAm) を 0.0217 ml 加え、開始剤として ammonium persulfate (APS) を 2.3 mg (0.0101 mmol) 加えて、5°C 窒素雰囲気化で 3 時間かき混ぜた。その後、蒸留水でよく洗浄したのち凍結乾燥により白色固体を得た。

[maltose monomer]/[MBAAm] = 6/4

十分に脱気した蒸留水 2.7 ml にマルトースビニルモノマー 0.609 g (純度 65.0 %, 0.797 mmol) を溶解させ、それに methylenebisacrylamide (MBAAm) を 82.0 mg (0.532 mmol) 加えて 5°C で窒素通気を 30 分間行った。その後、N,N,N',N'-tetraethylethyldiamine (TEEDAm) を 0.0172 ml 加え、開始剤として ammonium persulfate (APS) を 1.82 mg (0.00798 mmol) 加えて、5°C 窒素雰囲気化で 3 時間かき混ぜた。その後、蒸留水でよく洗浄したのち凍結乾燥により白色固体を得た。

[maltose monomer]/[MBAAm] = 5/5

十分に脱気した蒸留水 2.5 ml にマルトースビニルモノマー 0.308 g (純度 65.0 %, 0.403 mmol) を溶解させ、それに methylenebisacrylamide (MBAAm) を 62.1 mg (0.403 mmol) 加えて 5°C で窒素通気を 30 分間行った。その後、

N,N,N',N'-tetraethylethylendiamine (TEEDAm) を 0.00868 ml 加え, 開始剤として ammonium persulfate (APS) を 0.92 mg (0.00403 mmol) 加えて, 5°C 窒素雰囲気化で 3 時間かき混ぜた。その後, 蒸留水でよく洗浄したのち凍結乾燥により白色固体を得た。

[maltose monomer]/[MBAAm] = 0/10

十分に脱気した蒸留水 3.9 ml に methylenebisacrylamide (MBAAm) 85.0 mg (0.551 mmol) を溶解させ, 5°C で窒素通気を 30 分間行った。その後, N,N,N',N'-tetraethylethylendiamine (TEEDAm) を 0.0238 ml 加え, 開始剤として ammonium persulfate (APS) を 2.52 mg (0.0110 mmol) 加えて, 5°C 窒素雰囲気化で 3 時間かき混ぜた。その後, 蒸留水でよく洗浄したのち凍結乾燥により白色固体を得た。

5-2-7 レクチン吸着能評価

先に調製した Sil-Mal_n, Cel-Mal_n, メチレンビスアクリルアミド架橋ゲルに対する Concanavalin A (ConA) の吸着実験を行った。希薄溶液での実験が可能であることと、高感度であるという利点から蛍光プローブ Rhodamine を導入した Con A を用い、各吸着剤と混合したあとの溶液の蛍光強度から、Con A の吸着量を算出した。

使用した分析機器と測定条件を以下に示す。

蛍光分光光度計：JASCO FP-777

測定条件

励起波長：555 nm 蛍光波長：575 nm 励起側バンド幅：10 nm 蛍光側バンド幅：10 nm

データ取込間隔：0.5 nm 走査速度：100 nm/min

5-2-8 Rhodamine-Concanavalin A の定量

塩化カルシウム 27.75 mg をトリス塩酸緩衝液に 250 ml に溶解し、1mM 塩化カルシウム/トリス塩酸緩衝液を調製した。1mM 塩化カルシウム/トリス塩酸緩衝液と 5mg/ml Rhodamine-Con A 溶液を Table 5-2 に従って混合し、各種濃度の Rhodamine-Con A 溶液を調製し、蛍光スペクトル測定を行った。測定の結果、検量線の式 $y = 817.1x + 44.43$ を算出した。

Table 5-2 Preparation of various Rhodamine-Concanavalin A solution

R-Con A濃度 (mg/ml)	1mM塩化カルシウム/ トリス塩酸緩衝液(μl)	5mg/ml R-Con A (μl)
0.05	495	5
0.1	490	10
0.2	480	20
0.3	470	30
0.4	460	40
0.5	450	50
0.6	440	60

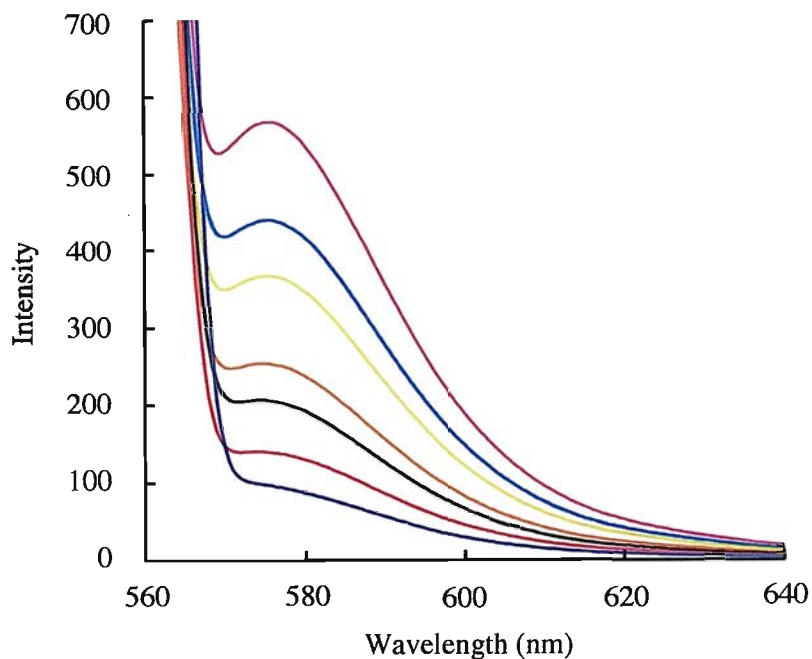


Figure 5-4 Fluorescence spectra of Rhodamine-Concanavalin A in 1mM CaCl₂/Tris/HCl buffer. Excitation wavelength is 555 nm.

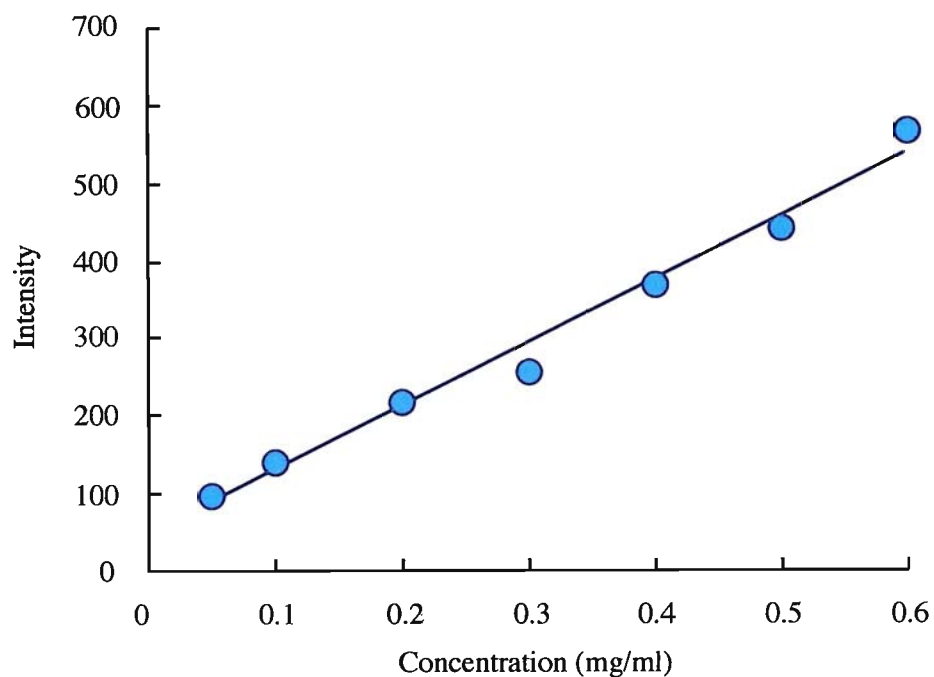


Figure 5-5 Concentration dependence of fluorescence intensity with Rhodamine-Concanavalin A at 575 nm. Excitation wavelength is 555 nm.

5-2-9 マルトースマクロマーグラフト化シリカによる吸着実験

Silca gel, Sil-Mal₅, Sil-Mal₁₀, Sil-Mal₂₀, Sil-Mal₃₀ を 3 mg ずつサンプル管に採取し, I 900ml と 5 mg/ml Rhodamine-Con A 溶液 100 ml を加え, 暗所で 1 時間静置したのちフィルターでろ過をし, ろ液を蛍光スペクトルにより測定した。測定結果を Figure 5-6, 5-7, 5-8 に示すと Silca gel を添加した場合が最も蛍光強度が低く, Silca gel に Con A が吸着されることが示唆された。Sil-Mal₅ において吸着量が減少したことについては, 担体の Silca gel にポリマー鎖が吸着され, 側鎖のマルトースの自由度が奪われて Con A が結合できなかつたことに加え, 吸着されたポリマー鎖によって Silca gel 自体にも Con A の吸着が起こらなかつたためと考えられる。また, 重合度が伸びるにつれて自由なマルトースが増加するため Con A の吸着量は増加し, Sil-Mal₃₀ では高分子効果により吸着量が一気に上昇したものと考えられる。

5-2-3 マルトースマクロマーグラフト化セルロースビーズによる吸着実験

Cellulose beads, Cell-Mal₅, Cell-Mal₁₀, Cell-Mal₂₀, Cell-Mal₃₀ を 3 mg ずつサンプル管に採取し, I を 900ml と 5 mg/ml Rhodamine-Con A 溶液 100 ml を加え, 暗所で 1 時間静置したのちフィルターでろ過をし, ろ液を蛍光スペクトルにより測定した。Figure 5-9, 5-10, 5-11 に示す結果から, Cellulose beads 自体には吸着は起きず, ポリマー鎖の重合度増加に伴う吸着量の増加が確認された。

5-2-4 マルトース/メチレンビスアクリルアミドゲルによる吸着実験

[maltose]/[MBAAm] = 0/10, 5/5, 6/4, 7/3, 8/2 のゲルを 3 mg ずつサンプル管に採取し, I を 900ml と 5 mg/ml Rhodamine-Con A 溶液 100 ml を加え, 暗所で 1 時間静置したのちフィルターでろ過をし, ろ液を蛍光スペクトルにより測定した。Figure 5-12, 5-13, 5-14 に示す結果から, マルトースの組成比増加に伴い, 吸着量の増加が確認された。

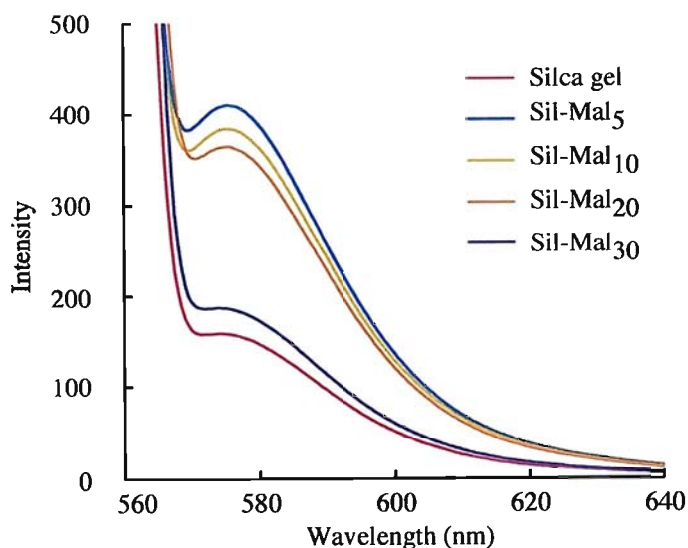


Figure 5-6 Fluorescence spectra of Rhodamine-Concanavalin A in the presence of Sil-Mal_n in 1mM CaCl₂/Tris/HCl buffer. Excitation wavelength is 555 nm.

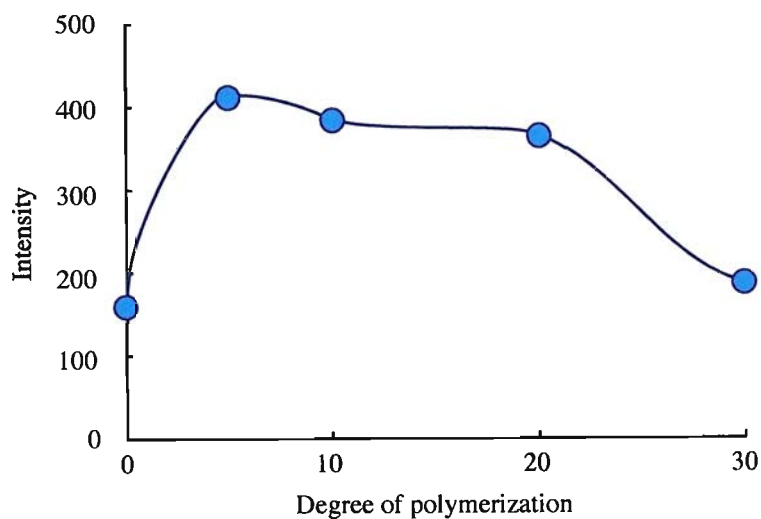


Figure 5-7 Polymerization degree of Sil-Mal_n dependence of fluorescence intensity at 575 nm

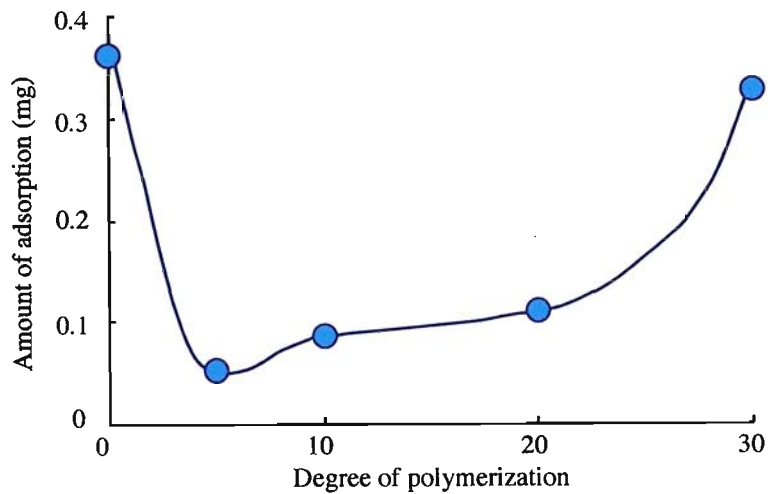


Figure 5-8 Polymerization degree of Sil-Mal_n dependence of amount of adsorption

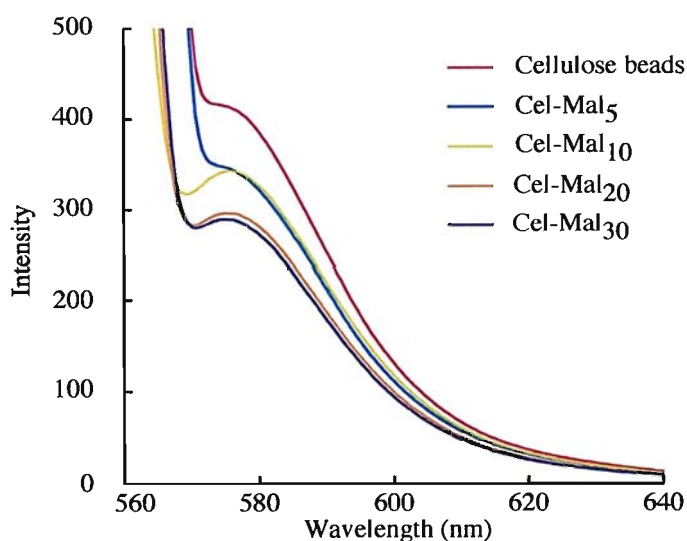


Figure 5-9 Fluorescence spectra of Rhodamine-Concanavalin A in the presence of Cel-Mal_n in 1mM CaCl₂/Tris/HCl buffer. Excitation wavelength is 555 nm.

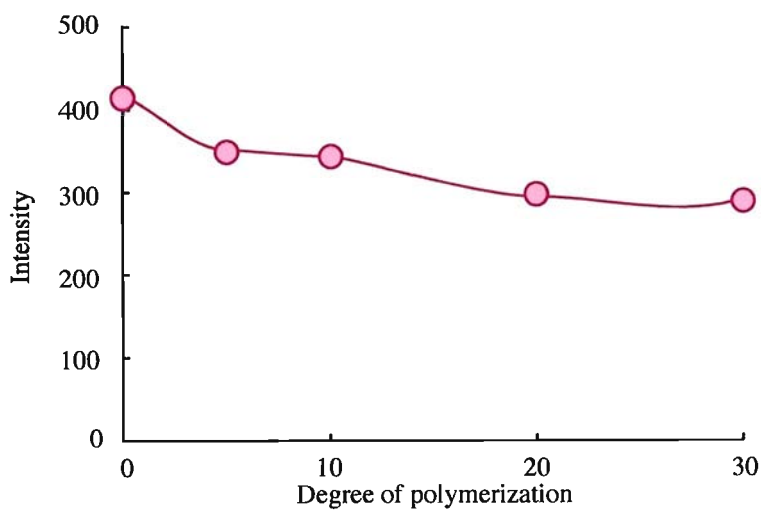


Figure 5-10 Polymerization degree of Cel-Mal_n dependence of fluorescence intensity at 575 nm

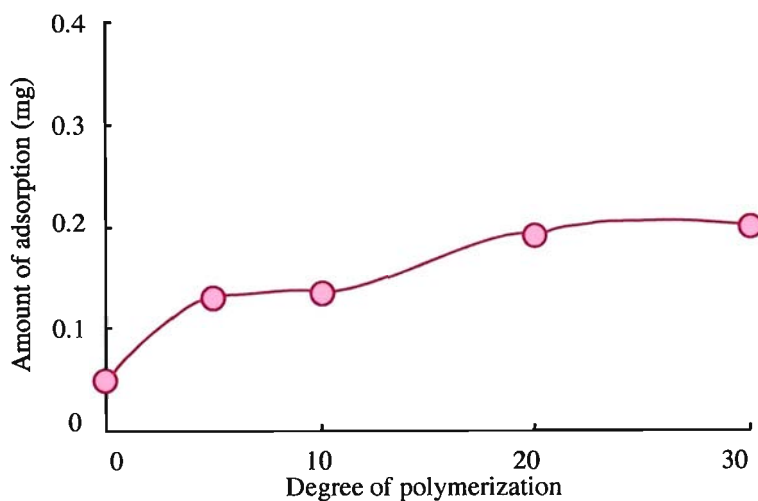


Figure 5-11 Polymerization degree of Cel-Mal_n dependence of amount of adsorption

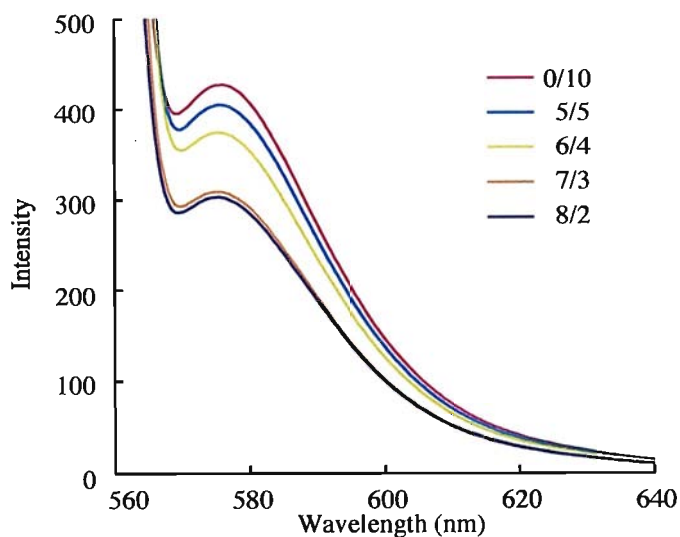


Figure 5-12 Fluorescence spectra of Rhodamine-Concanavalin A in the presence of copolymer beads in 1mM CaCl_2 /Tris/HCl buffer. Excitation wavelength is 555 nm.

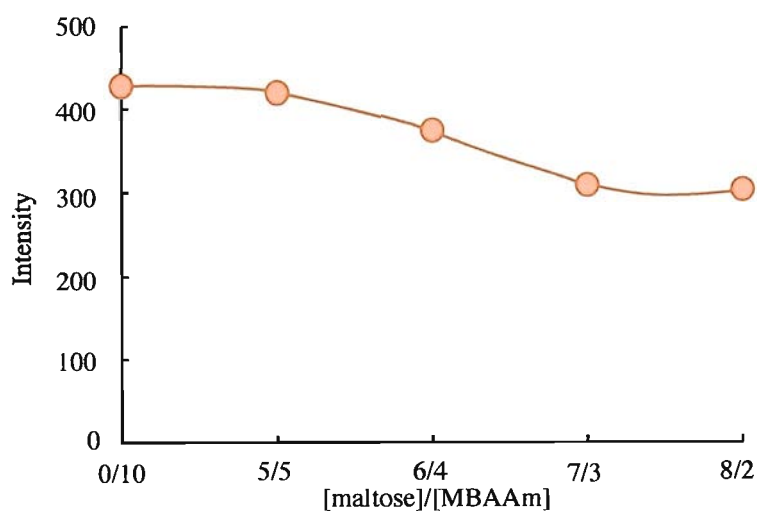


Figure 5-13 Molecular ratio dependences of fluorescence intensity at 575 nm

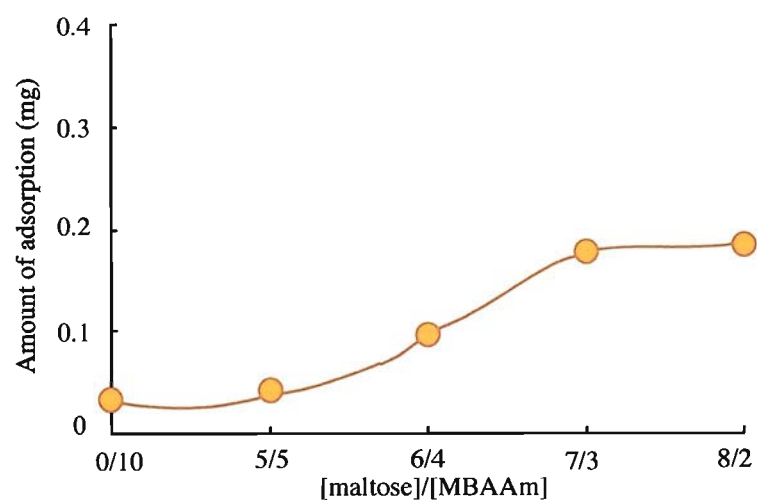


Figure 5-14 Molecular ratio dependences of amount of adsorption

5-3 酸素ガスバリアーフィルムへの応用

食品や医薬品、精密半導体部品などの包装用フィルムは、内容物の酸化、湿気防止機能が必要であり、その指標として酸素透過度と水蒸気透過度が重要なファクターとなる。従来より、酸素バリアフィルムとして、ポリ塩化ビニリデンが大量に利用されてきたが、1996年以來、脱塩素素材が求められ、環境に優しい材料への転換が行われるようになってきた。ポリ塩化ビニリデン以外で現存するフィルムで高い酸素バリア性を示す材料にポリビニルアルコール-エチレン共重合体、EVOHがある。これは、環境に比較的、優しい材料ではあるが、高湿度下において、酸素バリア性の低下が生じる。最近では、最も高い酸素バリアを示すフィルムとして、アルミなどの金属を蒸着した複合フィルムが開発されているが、コストが高いうえに、食品等の中の金属異物を検出する探知器を使用することができない。極性の高い高分子を用いたフィルムの場合、水素結合に由来した結晶性が高い程、ガスバリア性が高くなる。

そこで、本章では第3章で合成した poly (2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose) を Nylon フィルムにキャストし、そのガス透過性を評価した。

5-3-1 ガスバリア性

均一な厚さ l 、面積 A の高分子フィルムを厚さ方向にガスが定常状態で透過すると仮定する。ガスはフィルム表面に溶解し、次に高濃度側から低濃度側に向かって拡散していく。 t 時間にこの面積 A 、厚さ l のフィルムを通じて移動するガスの量 q は、次の Fick の第1法則 (4-1) の積分により与えられる。

$$R = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (\text{Fickの第1法則}) \quad (4-1)$$

ここで R は単位時間・単位面積あたりのガス移動速度、 D は拡散係数、 C は透過ガス濃度、 x はフィルム内の高濃度側の表面からの距離である。

$$q = DA \int_0^l \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right)_{x=l} dt \quad (4-2)$$

一方、 $\partial C / \partial x$ は一般の拡散式で Fick の第2法則 (4-3) に定常状態である条件、すなわち $\partial C / \partial t = 0$ 、 $x = 0$ 、 $C = C_1$ 、 $x = l$ 、 $C = C_2$ を与えることにより得られる。

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (\text{Fickの第2法則}) \quad (4-3)$$

よって、

$$\frac{\partial C}{\partial x} = -\frac{C_1 - C_2}{l} \quad (4-4)$$

従って、(4-2)、(4-4) より q は次式となる。

$$q = \frac{DA(C_1 - C_2)t}{l} \quad (4-5)$$

フィルム界面における濃度 C_1, C_2 は Henry の法則により、接しているガスの圧力 P_1, P_2 と平衡状態にある。

$$C_i = SP_i \quad (i = 1, 2) \quad (4-6)$$

ここで S は溶解度係数である。従って (4-5) は

$$q = \frac{DSA(p_1 - p_2)t}{l} \quad (4-7)$$

$A, (P_1 - P_2), t, l$ に CGS 単位で 1 を用い、このときの q を P で表すと、

$$P = D \cdot S \quad (4-8)$$

この P は透過係数である。すなわち透過係数 P は溶解度係数 S と拡散係数 D の積であり、単位は $\text{cc} \cdot \text{cm}/\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cmHg}$ である。また圧力法、同圧法など各種の測定法で測定されたサンプルのガス透過率には厚み因子が入っていない $\text{cc}/\text{m}^2 \cdot 24\text{hr} \cdot \text{atm}$ 単位が多く用いられている。

5-3-2 高分子構造とガスバリア性

Table 4-1 に各種高分子フィルムの主要ガスの透過度を示す。PVC や EVOH など、非常に良好な酸素ガスバリア性を示す高分子は、一般に極性基を含むものが多い。M. Salam⁵¹⁾ は、高分子の構成単位からガス透過度を推定する方法を提案している[®]。この方法では特定の高分子のガス透過度を測定し、またその高分子の凝集エネルギー密度と自由体積分率を計算することにより、酸素、窒素、炭酸ガスの透過度と式 (4-9) で関係づけている。

$$P = Ae^{-S\Pi} \quad (4-9)$$

ここで P は透過係数、 A 及び S は定数、 Π は高分子の Permachor である。先に述べたガスに対して計算された 25 °C における定数 A 及び S を Table 4-2 に示す。高分子の Permachor である Π は結晶化度にも依存してくる。結晶性高分子の Permachor は次式により与えられる。

$$\Pi = \Pi_a - 18 \ln a \quad (4-10)$$

5-3-3 ガスバリア性の湿度依存性

極性基を含む高分子の酸素ガス透過係数は低い値を示すがその中でも水酸基やアミド基などは水分子と結合しやすく、これらの基を含む高分子の酸素透過度は湿度の影響を受ける。Figure 4-1 に各種高分子フィルムの酸素ガス透過度の温度依存性を示す。また Figure 4-2 にその高分子構造を示す⁵²⁾。

Table 4-1 Gas transmission rate of each films

フィルム名	ガス透過度 ^a (cc /m ² hr atm)		
	CO ₂	N ₂	O ₂
LDPE	42500	2800	7900
HDPE	9100	660	2900
無延伸PP	12600	760	3800
2軸延伸PP	8500	315	2500
PVDCコート2軸延伸PP	8~80	8~30	<16
セロハン	6~90	8~25	3~80
PVDCコートセロハン	—	—	15 ^a
ポリエステル	240~400	11~16	95~130
無延伸ナイロン	160~190	14	40
2軸延伸ナイロン	—	—	30 ^a
PVDCコート2軸延伸ナイロン	—	—	10 ^a
PS	14000	880	5500
PC	17000	790	4700
EVOH (EVAケン化物)	—	—	1.5 ^b

a) 測定条件：25 °C，湿度 50 % b) 測定条件：27 °C，湿度 65 %

Table 4-2 Constant number of O₂ and N₂ and CO₂ gas for Permachor scheme

	A (25 °C)		S (25 °C)
	cc cm	cc mil	
	cm ² sec cmHg	100 in ² day atm	
O ₂	5.0 x 10 ⁻⁹	8.350	0.112
N ₂	2.0 x 10 ⁻⁹	3.340	0.120
CO ₂	3.2 x 10 ⁻⁸	53.40	0.122

5-3-4 酸素ガス透過性の評価

蒸留水 20 ml と dimethyl sulfoxide (DMSO) 163.6 ml を混合し 90 w% DMSO 水溶液を調製した。この 90 w% DMSO 水溶液 95 g に poly (2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose) 5 g を 12 時間浸せきし、5 w% poly (2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose) 溶液を調製した。その後この溶液を、0.45 mm メンブランフィルターでろ過し測定サンプルとした。この 5 w% polymer 溶液を厚み 15 mm のコロナ処理ナイロンフィルム ((株) 興人制, ポニール RX) にメイヤーバーに塗布し 100 °C で 2 分間乾燥させ厚さ 1.2 mm のポリマーコーティングフィルムを得た。

得られたポリマーフィルムを OX-TRAN®100 を用いて酸素ガス透過度を測定した。比較として先に用いた、厚み 15 mm のコロナ処理ナイロンフィルム ((株) 興人制, ポニール RX) をポリマーコーティングをせずにそのまま酸素ガス透過度を測定した。測定結果を Table 4-3, Figure 4-3 に示す。

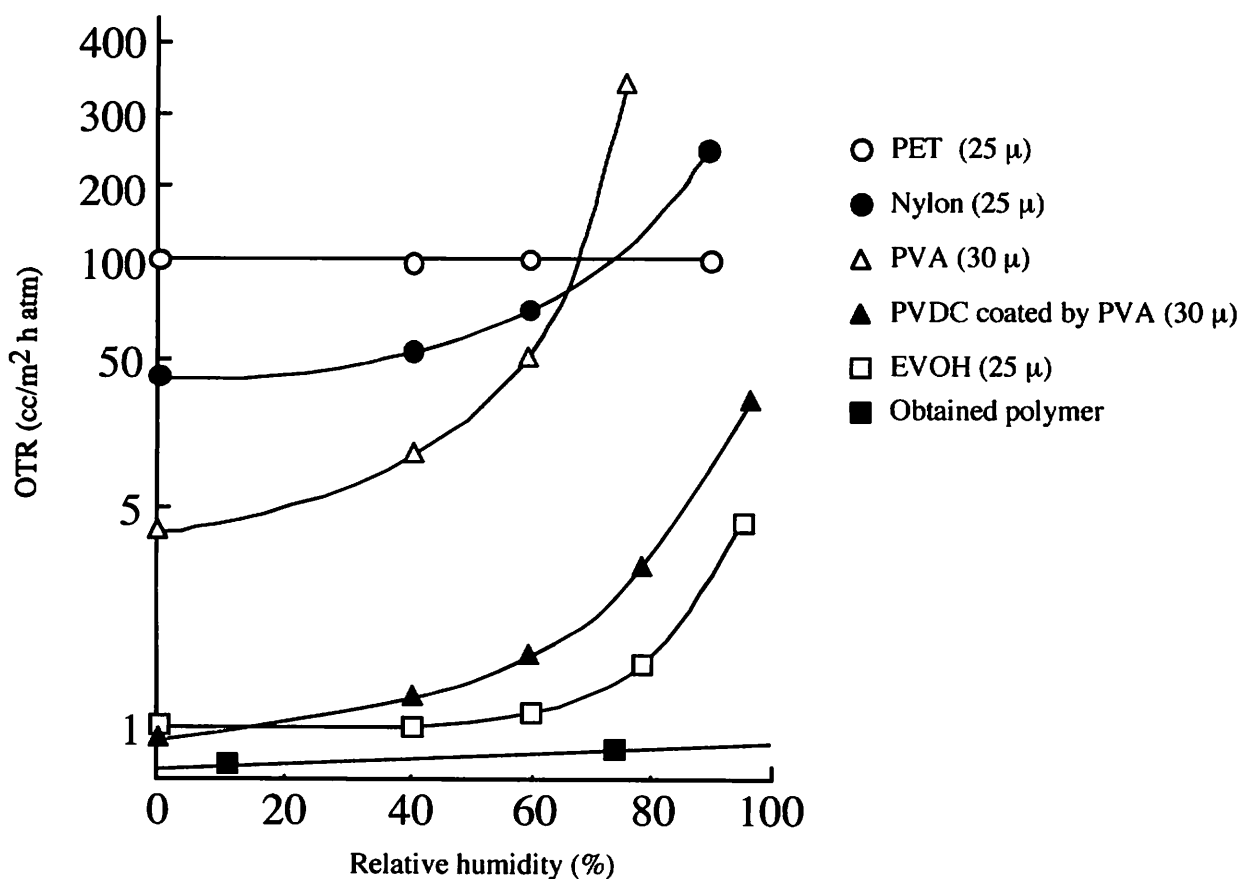


Figure 4-3 OTR of the obtained polymer coated film and other films

Table4-3 OTR of the obtained film and nylon film

Film	%RH	OTR
Coating film ^{a)}	13	0.15
	72	0.45
Non-coating film ^{b)}	13	35
	72	210

a) nylon-6 film coated by obtained polymer

b) nylon-6 film

ナイロンフィルムは、乾燥条件下（湿度 13%）で、酸素透過度 35 cc/m²・day・atm、湿潤条件下（湿度 72%）で 210 cc/m²・day・atm と酸素を著しく透過する。これに、poly (2-(methacryloyloxy)ethylureido cellobiose)をコートすると、乾燥条件下（湿度 13%）で酸素透過度 0.15 cc/m²・day・atm、湿潤条件下（湿度 72%）で 0.45 cc/m²・day・atm と飛躍的に酸素ガスバリア性が増大した。フィルムのコート厚が現存のフィルムよりも 1/10 程度の厚みでありながら、図に示すように、現存する材料の中で最も高い酸素ガスバリア性を有するアルミ蒸着フィルムよりも高いガスバリア性を示した。一方、セルロースフィルムが、湿潤時でガスバリア性が著しく低下するのに対し、得られたフィルムがほとんど、低下しないのは、糖の有する水素結合の効果を反映していると考えられる。開発された素材は、環境に優しいセルロース由来であるうえに、湿度変化の影響を受けない。このことは、今後、包装材料の分野の中で、波及効果を伴った応用展開が期待できる。

第六章
總括

本研究では、オリゴ糖の水酸基に保護基を用いず簡便な合成経路で重合性官能基を導入しマクロモノマー化し、さらにその重合物の主に水溶液中での形態観察及び機能評価について検討した。さらに、それらのマクロモノマーを用いた、機能性材料への応用についても検討した。

第1章は序論であり、最近のオリゴ糖をもちいた研究例、オリゴ糖を分子内にもつ高分子の合成などを例に上げて本研究の目的及び研究方法等について、論じている。

第2章では、単糖類のグルコース、二糖類のセロビオース、マルトース、さらにセロトリオース、マルトトリオースなどのオリゴ糖に保護基を用いない簡便な合成スキームで、重合性官能基を導入について検討し、オリゴ糖の水酸基のうち還元性を示す第一位の水酸基のみをアミノ基に変換したのち、水酸基とアミノ基の反応性の違いを利用して、多数の水酸基を保護することなく、アミノ基のみに重合性官能基を導入することが可能であることが明らかになった。その分子構造は、HPLC, FT-IR, NMR測定によって評価した。

第3章では、得られたオリゴ糖マクロモノマーを水系重合反応によりポリマー化し、その分子量・分子量分布、光散乱及び透過電子顕微鏡等を用いて溶液物性についても検討した。その結果、重合により得られたオリゴ糖側鎖型ポリマーは、水中においてプルラン換算で数千万の分子量に相当する巨大な会合体として存在することがサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) の測定結果より明らかになった。さらに光散乱及び透過電子顕微鏡観察より、会合体は20~30 nmの真球状であることが確認された。

第4章では、新たに調製した両親媒性オリゴ糖高分子を利用し、高分子ミセル型のナノ粒子の創製について検討を行った。高分子主鎖の片末端のみに疎水部を導入した両親媒性化合物と、高分子側鎖に疎水部を導入した両親媒性化合物を合成し、臨界ミセル濃度や、会合形態などを調査した。その結果、高分子主鎖の片末端のみに疎水部を導入した両親媒性化合物においては、規則的な疎水空間をもつミセルを形成することが明らかになった。

第5章では、得られたポリマーの酸素ガスバリアフィルムへの応用を検討した。その結果、現存する親水性高分子から調製されたフィルムと比較して優れたバリア性をもつことが示され、さらに高温状態においても高いバリア性を保持することも明らかになった。加えて、シリカゲル等にポリマーをグラフト化することによってレクチン吸着剤などへの応用を検討し、特定のレクチンのみを吸着することが確認され、レクチン吸着剤として有用であることを確認した。

還元性をもつオリゴ糖をマクロマー化する手法の確立、及び少数ではあるがそのマクロマー群の構築を達成した。機能評価からも、オリゴ糖が元来もち得なかった機能の発現も示唆された。

参考文献

- 1) K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Glycobiol.*, **10**, 1157 (2000)
- 2) P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature*, **403**, 669 (2000)
- 3) T. W. Rademacher, R. B. Parekh, R. A. Dwek, *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 785 (1988)
- 4) T. E. Hardingham, A. J. Fosang, *FASEB journal*, **6**, 861 (1992)
- 5) G. Wulff, J. Schmid, T. Venhoff, *Macromol. Chem. Phys.*, **197**, 259 (1996)
- 6) T. Miyata et al., *Trends Polym. Sci.*, **5**, 198 (1997)
- 7) T. Kitazawa, M. Okumura, K. Kinomura, T. Sakakibara, *Chem. Lett.*, **19**, 1733 (1990)
- 8) E. Kallin, H. Lonn, T. Norberg, M. Elofsson, *J. Carbohydr. Chem.*, **8**, 597, (1989)
- 9) S. Shibatani et al., *Biotechnol. Lett.*, **19**, 511 (1997)
- 10) S. Nishimura, K. Matsuoka, K. Kurita, *Macromolecules*, **23**, 4182 (1990)
- 11) S. Shoda, M. Fujita, C. Lohavisavapanichi, Y. Misawa, K. Ushizaki, Y. Tawata, M. Kuriyama, H. Kuwata, T. Watanabe, *Hel. Chim. Acta*, **85**, 3919 (2002)
- 12) M. Fujita, S. Shoda, K. Haneda, T. Inazu, K. Takegawa, K. Yamamoto, *Biochem. Biophys. Acta*, **1528**, 9 (2001)
- 13) K. Yamada, M. Miyazaki, K. Ohno, T. Fukuda, M. Minoda, *Macromolecules*, **32**, 290 (1999)
- 14) K. Matyjaszewski, T. E. Patten, J. Xia, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 674 (1997)
- 15) K. Yamada, K. Yamaoka, M. Minoda, T. Miyamoto, *J. Polym. Sci.*, **A35**, 255 (1997)
- 16) K. Yamada, M. Minoda, T. Miyamoto, *J. Polym. Sci.*, **A35**, 751 (1997)
- 17) C. Fraser, R. H. Grubbs, *Macromolecules*, **28**, 7248 (1995)
- 18) C. J. Hawker, A. W. Bosman, E. Harth, *Chem. Rev.*, **101**, 3661 (2001)
- 19) A. Narumi, T. Matsuda, H. Kaga, T. Satoh, T. Kakuchi, *Polymer*, **43**, 4835 (2002)
- 20) J.-S. Wang, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5614 (1995)
- 21) J. J.-Grodzinski, *Reactive & Functional Polymers*, **49**, 1 (2001)
- 22) M. Karakawa, H. Kamitakahara, T. Takano, and F. Nakatsubo, *Biomacromolecules*, **3**, 538 (2002)
- 23) K. Matsuura, H. Kitakouji, R. Oda, Y. Morimoto, H. Asano, H. Ishida, M. Kiso, K. Kitajima, K. Kobayashi, *Langmuir*, **18**, 6940 (2002)

- 24) T. Hasegawa, K. Matsuura, K. Ariga, K. Kobayashi, *Macromolecules*, **33**, 2772 (2000)
- 25) T. Fujimoto, C. Shimizu, O. Hayashida, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 6676 (1997)
- 26) K. Matsuura, H. Kitakouji, N. Sawada, H. Ishida, M. Kiso, K. Kitajima, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 7406 (2000)
- 27) N. Kojima, S. Hakomori, *J. Biol. Chem.*, **264**, 20159 (1989)
- 28) T. Furuzono, K. Ishihara, N. Nakabayashi, Y. Tamada, *Biomaterials*, **21**, 327 (2000)
- 29) C. Kuhlmeier, J. Klein, *Enzyme and Microbial Technology*, **6196**, 1 (2002)
- 30) M. Enoki, T. Watanabe, Y. Honda, M. Kuwahara, *Chem. Lett.*, **29**, 54 (2000)
- 31) K. Kobayashi, A. Tsuchida, T. Usui, T. Akaike, *Macromolecules*, **30**, 2016 (1997)
- 32) M. Akashi, N. Sakamoto, K. Suzuki, A. Kishida, *Bioconjugate Chem.*, **7**, 393 (1996)
- 33) San H. Thang, Y. K. Chong, Roshan. T. A. Mayadunne, Graeme Moad, and Ezio Rizzardo, *Tetrahedron Letters*, **40**, 2435 (1999)
- 34) H. Hatakeyama, H. Yoshida, J. Nakano, *Carbohydr. Res.*, **47**, 203 (1976)
- 35) E. Kallin, H. Lonn, T. Norberg, M. Elofsson., *J. Carbohydr. Chemistry*, **8**, 597 (1989)
- 36) J. Klein, *Macromol. Chem.*, **190**, 2527 (1989)
- 37) E. E. Conn et al., *Outlines of Biochemistry*, W & S inc. p.21-50 (1963)
- 38) J. Klein, D. Herzog, *Macromol. Chem.*, **188**, 1217 (1987)
- 39) U. Yildiz, B. Hazer, *Polymer*, **41**, 539 (2000)
- 40) M. S. Donovan, T. A. Sanford, A. B. Lowe, B. S. Sumerlin, Y. Mitsukami, C. L. McCormick, *Macromolecules*, **35**, 4570 (2002)
- 41) Y. Tsuji, M. Ejaz, K. Sato, A. Goto, T. Fukuda, *Macromolecules*, **34**, 8872 (2001)
- 42) J. F. Quinn, T. P. Davis, E. Rizzardo, *Chem. Commun.*, 1044 (2001)
- 43) F. Ganachaud, M. J. Monteiro, R. G. Gilbert, M.-A. Dourges, S. H. Thang, E. Rizzardo, *Macromolecules*, **33**, 6738 (2000)
- 44) T. Kato, T. Okamoto, T. Tokuyam, A. Takahashi, *Biopolym.*, **21**, 1623 (1982)
- 45) K. Kawahara, K. Ohta, H. Miyamoto, S. Nakamura, *Carbohydr. Polym.*, **4**, 335 (1984)
- 46) R. Kornfeld, C. Ferris, *J. Biol. Chem.*, **250**, 2614 (1975)

- 47) K. Yamamoto, Y. Konami, T. Osawa, T. Irimura, *FEBS Lett.*, **281**, 258-262 (1991)
- 48) K. Yamamoto, Y. Konami, T. Osawa, T. Irimura, *J. Biochem.*, **111**, 436-439 (1992)
- 49) K. Yamamoto, Y. Konami, T. Osawa, T. Irimura, *J. Biochem.*, **111**, 87-90 (1992)
- 50) K. Yamamoto, Y. Konami, T. Osawa, *J. Biochem.*, **127**, 129-135 (2000)
- 51) K. Yamamoto, I. N. Maruyama, T. Osawa, *J. Biochem.*, **127**, 137-142 (2000)
- 52) K. Drickamer, *Nature*, **360**, 183 (1993)
- 53) H. Hatakeyama, H. Yoshida, J. Nakano, *Carbohydr. Res.*, **47**, 203 (1976)
- 54) K. Nakamura, T. Hatakeyama, H. Hatakeyama, *Polymer*, **24**, 871 (1983)
- 55) K. Nakamura, *Text. Res. J.*, **53**, 682 (1983)
- 56) G. Bastiat, B. Grassl and J. Francois, *Polym Int*, **51**, 958 (2002)
- 57) S. J. Singer, Garth L. Nicolson, *Science*, **175**, 720 (1972)
- 58) T. Kunitake, Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 3860 (1977)
- 59) Y. Morishima, S. Nomura, M. Seki and M. Kamachi, *Macromolecules*, **28**, 2874 (1995)
- 60) K. Akiyoshi, S. Deguchi, N. Moriguchi, S. Yamaguchi and J. Sunamoto, *Macromolecules*, **26**, 3062 (1993)
- 61) K. Akiyoshi, S. Kobayashi, S. Shichibe, D. Mix, M. Baudys, S. W. Kim, J. Sunamoto, *J. Controlled Release*, **54**, 313 (1998)
- 62) C. Scholz, M. Iijima, Y. Nagasaki and K. Kataoka, *Macromolecules*, **28**, 7295 (1995)
- 63) Y. Nagasaki, T. Okada, C. Scholz, M. Iijima, M. Kato and K. Kataoka, *Macromolecules*, **31**, 1473 (1998)
- 64) M. Akashi, T. Yanagi, E. Yashima and N. Miyaguchi, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem. Ed.*, **27**, 3521 (1989)
- 65) M. Riza, S. Tokura, M. Iwasaki, E. Yashima, A. Kishida and M. Akashi, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem. Ed.*, **33**, 1219 (1995)
- 66) T. Serizawa, M. Q. Chen and M. Akashi, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, **36**, 2581 (1998)
- 67) M. Akashi, T. Niikawa, T. Serizawa, T. Hayakawa, M. Baba, *Bioconjugate Chem.*, **9**, 50 (1998)
- 68) J. Jacques et al., Jhon Willy & Sons, New York (1981)
- 69) E. Gil-Av, B. Feibush, *Tetrahedron Lett.*, **35**, 3345 (1967)
- 70) S. Shimizu, S. Hattori, H. Hata, H. Yamada, *Enzym. Micro. Technol.*, **9**, 411 (1987)

- 71) Jensen, E. V. *Science*, **130**, 1319 (1959).
- 72) D. R. Grassetti, J. F. Murray, *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 41 (1967).
- 73) D. R. Grassetti, J. F. Murray, H. T. Ruan, *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 603 (1969).
- 74) K. Okuda, *J. Polym. Sci.*, **A24**, 1749 (1964)
- 75) F. A. Long, L. J. Thompson, *J. Polym. Sci.*, **14**, 321 (1954)
- 76) M. Salame, *Proc. Future-Pack*, **Dec. 3-5**, pp. 119 (1984)
- 77) Y. P. Khanna, E. D. Day, M. L. Tsai, *J. Plastic Film & Sheeting*, **13**, 197 (1997)

謝辞

研究室配属より6年間にわたり本研究に対し、常に的確で懇切なる、御指導、御助言を頂きました伊原博隆教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、昼夜を問わず常に適切な御指導、御助言を頂きました熊本県工業技術センターの永岡昭二氏に厚く御礼申し上げます。

また、研究期間中、常に暖かい御助言、御協力を頂きました高藤誠助教授、櫻井敏彦助手（現・鳥取大学助教授）に心から感謝申し上げます。

本論文執筆にあたり、ご協力頂きました石橋崇正氏（現・九州長瀬株式会社）、益田裕樹氏（現・株式会社同仁化学研究所）、山本祐歌氏に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、研究試薬の提供及び酸素ガス透過性試験において多大なご協力を頂きました株式会社興人の丸山学士氏、石原晋一郎氏に厚くお礼申し上げます。

さらに、暖かい御指導、御助言を頂きました西原正通氏（現・神奈川科学アカデミー）、山田泰輔氏（現・Georgetown University）、城崎智洋氏（現・日本油脂株式会社）をはじめとする先輩諸氏に深く御礼申し上げます。また後輩諸氏に深く御礼申し上げます。

本学工学部在学中より10年間公私にわたりお付き合いいただき、さらに本研究を行うにあたり多種多様の便宜をはかって頂きました、春藤淳臣氏に厚く感謝申し上げます。

最後に、長年にわたって暖かく御支援して下さった皆様と、絶えず支えになってくれた両親に心から感謝いたします。