

# Graft Copolymerization of Acrylates onto Collagen Membrane and Permeation Behavior

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Nakamoto, Yoshiaki, Kasamatsu, Harumi, Tatsumi, Junichi, Ishida, Shinichiro メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24517/00011683">https://doi.org/10.24517/00011683</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



# コラーゲン膜へのアクリルモノマーのグラフト重合と溶質透過性

中本義章\*, 笠松はるみ\*\*, 辰巳純一\*\*, 石田真一郎\*\*

## Graft Copolymerization of Acrylates onto Collagen Membrane and Permeation Behavior

Yoshiaki NAKAMOTO, Harumi KASAMATSU, Junichi TATSUMI, and Shin-ichiro ISHIDA

### Abstract

Grafting of methyl methacrylate (MMA), 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), methacrylic acid (MAA) and glycidyl methacrylate (GMA) onto calf hide collagen membrane was carried out using ceric ion as a redox initiator. The epoxy group of GMA-grafted collagen membrane was modified by hydrolysis, sulfonation, or aminolysis.

Membrane permeability of urea was increased by grafting of hydrophilic polymer such as HEMA, MAA or sulfonated GMA-grafts, and vitamin B<sub>12</sub> permeates easily in MAA-grafted membrane.

It is thought that the collagen membranes modified by graft copolymerization can be applied for dialysis.

### 1. 緒 言

人工肺や人工腎臓など膜透過機能を利用した人工臓器の開発にあたって、第一に優れた物質透過性を有する高分子膜材料を合成することが重要であろう。現在人工腎臓透析膜として実用化されている再生セルロース膜（キュプロファン）においても、毒性物質ことに中分子量物質の除去能力が十分とはいえず、血液浄化に長時間を要しており、キュプロファン膜より優れた特性を持つ新しい高分子材料の開発が望まれている。すなわち、老廃物特に中分子量物質の透過速度が大きく、かつ湿潤時の十分な膜強度と抗血栓性を有する高分子材料である。

コラーゲンは動物の結合組織に存在する繊維状タンパク質であり、皮より大量に精製分離することができる。このコラーゲン繊維は、電気化学的方法<sup>1)</sup>およびキャスト法<sup>2)</sup>において良好な製膜性を示す。

宮田は、コラーゲン透析膜の透析能がキュプロファン膜より優れていることを報告している<sup>3)</sup>。しかし、湿潤時における機械的強度は十分ではなく、またコラー

ゲン上への血小板凝集は起りやすく<sup>4)</sup>、血液適合性に問題があると思われる。

本研究は、コラーゲンを基材とする合成ポリマーとの複合膜について、膜透過性の低下を起こさずに機械的強度や抗血栓性の向上した素材を開発することを究極の目的とするものであり、本報では、合成ポリマーとコラーゲンとの複合化の方法としてコラーゲン膜への各種アクリルモノマーのグラフト重合反応を検討した。また、メタクリル酸グリシジルグラフトコラーゲン膜のエポキシ基の化学修飾による新しいグラフト膜の合成方法について報告する。さらに得られたグラフトコラーゲン膜について、人工透析に関係する種々の溶質の膜透過性の点から評価を行った。

### 2. 実 験

#### 2. 1 コラーゲンの精製

牛皮（ホルスタイン成牛，雄）を碎断し，アセトンで脱脂後，冷水で十分に洗浄した。さらに10%食塩水で可溶性タンパク質とムコ多糖を除去し，0.1%クエン酸緩衝液（pH 4.3）で可溶性コラーゲンを抽出除去し不溶性コラーゲンを得た。これに水を加えてホモジナイザーで懸濁液を調製し，エタノール中に加えて繊維

\* 複合材料応用研究センター

\*\*工業化学科

状に析出したコラーゲンを凍結乾燥し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## 2. 2 コラーゲン懸濁液の調整

精製コラーゲン 10 g に水 990 g を加え、ホモジナイズしながら塩酸で pH 4 に調整し、約 1% の懸濁液とした。懸濁液中のコラーゲン濃度は、所定量の懸濁液を加熱乾固し、重量測定により求めた。

## 2. 3 コラーゲン膜の調整

コラーゲン懸濁液 (1%) 100 ml を十分に脱泡し、21 cm  $\times$  21 cm のテフロン板上にキャストし、風乾して膜厚約 80  $\mu\text{m}$  の膜を得た。コラーゲン懸濁液の濃度を変えることにより膜厚を調整した。

## 2. 4 コラーゲン繊維へのグラフト重合

グラフト重合の一例を示す。攪拌装置、還流冷却器、窒素ガス導入管、温度計を備えたフラスコ中にコラーゲン懸濁液 (1%) 50 g および硝酸セリウムアンモニウム (CAN) 溶液 (0.25 mol/l-1N  $\text{HNO}_3$ ) 0.1 ml を加え、窒素雰囲気中で 30 分間攪拌した。その後、メタクリル酸メチル (MMA) 0.025 mol を添加し、 $30^{\circ}\text{C}$  で 3 時間重合反応を行った。反応後、アセトン 250 ml を加えて遠心分離によりポリマーを回収した。さらにポリマーをベンゼンで 36 時間ソックスレー抽出し、ホモポリマーを十分に分離してグラフトポリマーとホモポリマーの重量を測定した。

なお、モノマーとしては、メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル (HEMA)、メタクリル酸 (MAA)、メタクリル酸グリシジル (GMA) およびアクリロニトリル (AN) を使い、HEMA と MAA はメタノール、GMA はメチルエチルケトン、AN はジメチルホルムアミドをホモポリマー除去溶媒に用いた。

## 2. 5 コラーゲン膜へのグラフト重合

コラーゲン膜へのグラフト重合は 2. 4 と同様の方法で行った。コラーゲン膜をアセトンに浸漬し脱水し、十分に真空乾燥後重量および膜厚を測定した。ついで、この膜を反応フラスコ中に入れ、水 50 ml および CAN 溶液を加えて窒素雰囲気下 30 分間放置し、モノマーを加えて重合反応を行った。反応後、ホモポリマーを除去し、真空乾燥して重量増加を測定した。

## 2. 6 GMA グラフトコラーゲン膜の化学修飾

GMA グラフトコラーゲン膜のエポキシ基の加水分解反応は、1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中、 $40^{\circ}\text{C}$  で 6 時間行った。スルホン化は Paul の方法<sup>9)</sup>に従い、またアミノリシスは Cherbulez らの方法<sup>9)</sup>によりジエチルアミンを作用さ

せて行った。

## 2. 7 膜透過係数の測定

ガラス製膜透過セルを用いて、尿素、クレアチニン、尿酸およびビタミン  $\text{B}_{12}$  の膜透過係数を  $25^{\circ}\text{C}$  で測定した。セルの溶液側には、尿素およびクレアチニンは 0.1 mol/l 水溶液、尿酸は 0.05 mol/l - 0.1 N 炭酸リチウム溶液、ビタミン  $\text{B}_{12}$  は 0.005 mol/l 水溶液を 80 ml 加え、溶媒側にはそれぞれ対応する水または 0.1 N 炭酸リチウム溶液 80 ml を加え、膜を透過してくる溶質量の経時変化を測定した。

尿素はジアセチルモノオキシム法<sup>7)</sup>、クレアチニンは Jaffe 反応法<sup>8)</sup>、尿酸は Caraway 変法<sup>9)</sup>、ビタミン  $\text{B}_{12}$  は吸光光度法<sup>10)</sup>により定量した。なお、膜面積は 1.1  $\text{cm}^2$  である。

## 2. 8 IR スペクトル

グラフトコラーゲン膜の IR スペクトルは、日本分光製 A-202 IR スペクトロメータを用いてフィルム状試料として測定した。

## 3. 結果と考察

### 3. 1 コラーゲン膜へのグラフト重合と化学修飾

Rao らは CAN を開始剤に用いて可溶性コラーゲンおよび不溶性コラーゲンと MMA との重合を検討し、濁度測定、IR スペクトル、さらに幹コラーゲンの加水分解後の枝ポリマー上にアミノ酸残基が検出されることから、生成物は単なるコラーゲンとポリ MMA との混合物ではなく、真にグラフト重合が起っていることを明らかにした<sup>11,12)</sup>。

本実験においてもコラーゲン膜へのアクリルモノマーのグラフト重合を検討するにあたって、Rao らの方法に従ってコラーゲン懸濁液を用いて各種モノマーの重合性を比較した。その結果を表 1 に示す。

ここで、グラフト率およびグラフト効率<sup>13)</sup>は以下のように定義される。

Table 1 Graft copolymerization of acrylate monomers on collagen fiber

monomer	grafting %	grafting efficiency %
MMA	47	63
HEMA	292	94
MAA	91	91
GMA	479	92
AN	3	45

collagen fiber suspension: 10g/l, monomer: 0.5mol/l, CAN:  $5 \times 10^{-4}$  mol/l,  $\text{HNO}_3$ :  $2 \times 10^{-3}$  mol/l,  $30^{\circ}\text{C}$ , 3h.

$$\text{グラフト率} = \frac{\text{グラフト枝ポリマー}(g)}{\text{幹コラーゲン}(g)} \times 100$$

グラフト効率

$$= \frac{\text{グラフト枝ポリマー}(g)}{\text{グラフト枝ポリマー} + \text{ホモポリマー}(g)} \times 100$$

表1より、グラフト重合のしやすさは、GMA > HEMA > MAA > MMA > ANの順であり、GMAやHEMAでは開始剤やモノマー濃度を増加させることによりグラフト率が数千にまで達することも可能であり、極めて反応性に富んでいる。またグラフト効率も90%以上となり、ほとんどホモポリマーを生成しない。一方、ANではグラフト率、グラフト効率ともに小さく、コラーゲンの改質は行えないことがわかった。

つぎに、あらかじめ製膜したコラーゲンへのグラフト重合により得られた膜のIRスペクトルを図1に示した。

コラーゲン膜ではペプチド結合のアミド吸収が $1660\text{ cm}^{-1}$ に表われるのに対して、アクリルモノマーを反応させた膜では $1700\sim 1735\text{ cm}^{-1}$ にエステルあるいは

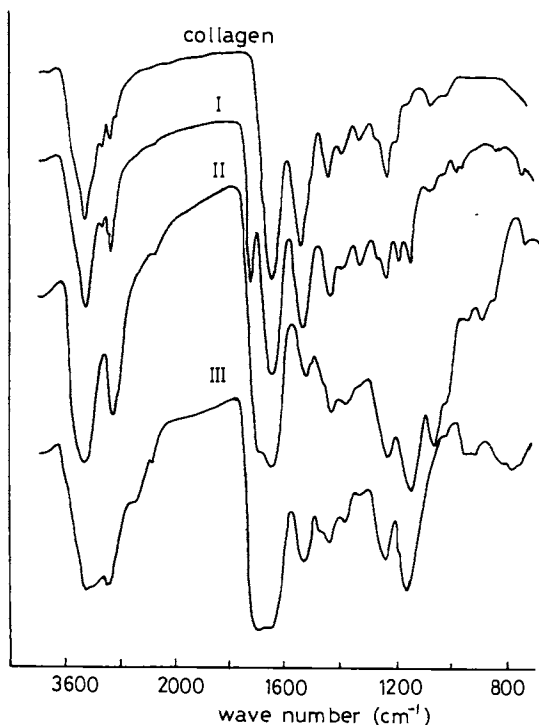


Fig. 1 IR spectra of collagen graft membranes  
I : MMA-grafted, II : HEMA-grafted,  
III : MAA-grafted

はカルボン酸のカルボニル吸収が顕著に見られ、膜表面においてもこれらアクリルモノマーのグラフト重合が起っていることが確認された。

図2にはGMAグラフト膜およびそのエポキシ基に対して化学修飾した膜のIRスペクトルを示した。

GMAグラフトコラーゲン膜では、エステル基の吸収が $1730\text{ cm}^{-1}$ に、エポキシ基の吸収が $900\text{ cm}^{-1}$ に見られるが、加水分解により $3400\text{ cm}^{-1}$ 付近の水酸基の吸収が大きくなりエポキシ基の吸収が消失した。またスルホン化膜ではOH領域の吸収の増大と、スルホン基による $1250\sim 1150\text{ cm}^{-1}$ 、 $1030\text{ cm}^{-1}$ の吸収が見られる。アミノ化膜では3級アミノ基の吸収が $2800\text{ cm}^{-1}$ に見られる。以上の結果、化学修飾によりそれぞれ水酸基、スルホン基、アミノ基が導入されたものと考えられる。

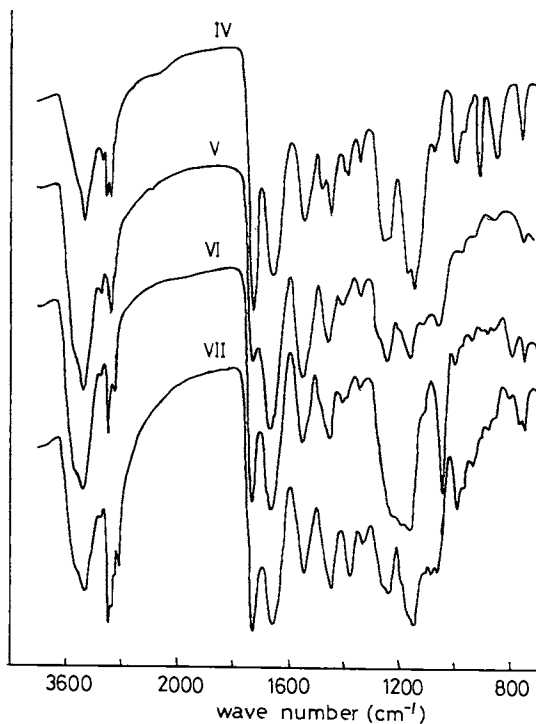


Fig. 2 IR spectra of GMA-grafted collagen membrane and chemically modified membranes  
IV : GMA-grafted, V : hydrolysis,  
VI : sulfonation, VII : aminolysis

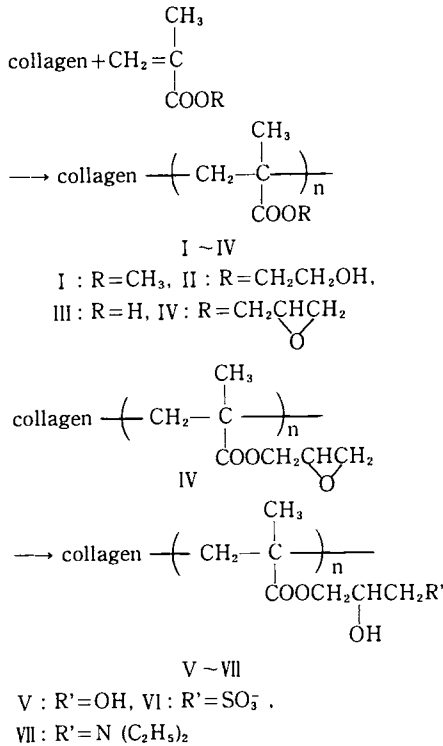


Fig.3

### 3. 2 グラフトコラーゲン膜の吸水性

前述のように合成した各種グラフトコラーゲン膜を水中に浸漬し、膜中の水分含有量を測定した。

いずれのグラフト膜においても、グラフト率の低い場合に未処理コラーゲン膜よりも吸水性が増大することが見出され、グラフト率の増加とともに吸水率は減少した。また枝ポリマーが水酸基やイオン解離性の親

水基を有する場合には、膜はより親水性を示すことが明らかである。種々の修飾コラーゲン膜で著しい親水性を有したのは低グラフト率の HEMA-コラーゲン膜 (II) およびスルホン化 GMA-コラーゲン膜 (VI) であった。

また、ジエチルアミノ化膜 (VII) は比較的親水性に乏しく、この膜をさらにエチルプロミドにより 4 級アンモニウムイオン型に変換したところ (膜 VIII), 予期されるように親水性は増加した。

### 3. 3 グラフトコラーゲン膜における尿素的透過性

各種グラフトコラーゲン膜における尿素的透過係数を表 3 にまとめて示した。

膜透過係数は次式で定義される。

$$J = P \cdot \frac{A}{l} \cdot \Delta C \cdot t = P' \cdot A \cdot \Delta C \cdot t$$

ここで、 $J$  は膜中を拡散する物質のフラックス、 $A$  は膜面積、 $l$  は膜厚、 $\Delta C$  は膜の両側での濃度差、 $t$  は拡散時間、 $P$  および  $P'$  は透過係数である。 $P$  は拡散係数と同じ次元であり膜材料の透過能を評価する値である。その値の決定には湿潤時の膜厚が必要であるが、本実験では求めることができなかったので乾燥膜厚を用いて算出した。一方、 $P'$  は膜厚を含めた係数であり、実用的評価を行うのに重要である。

表 2 より、コラーゲン膜表面へアクリルモノマーをグラフトさせると、透過性の向上する場合をいくつも見出すことができた。すなわち、HEMA や MAA のような親水性ポリマーとのグラフト体では膜透過係数は大きくなった。さらに、MMA のような比較的疎水性と考えられるポリマーにおいても透過性が増大するこ

Table 2 Water content of the modified collagen membranes

membrane	grafting % <sup>a)</sup>	thickness ( $\mu\text{m}$ )	water content (%)
untreated collagen	—	21	200
I	153	51	116
II	171	36	262
III	170	51	184
untreated collagen	—	82	235
V	48	211	484
VI	48	244	519
VII	48	248	337
VIII	48	276	403

a) Grafting % of V, VI, VII and VIII are based on the precursor IV.

Table 3 Permeability of urea through the collagen membranes modified by graft copolymerization

membrane	grafting % <sup>a)</sup>	thickness ( $\mu\text{m}$ )	permeability	
			$P$ ( $\times 10^{-6}\text{cm}^2/\text{sec}$ )	$P'$ ( $\times 10^{-4}\text{cm}/\text{sec}$ )
untreated collagen	—	21	0.98	4.7
I	79	34	2.3	6.8
	153	51	1.6	3.1
II	38	33	2.1	6.4
	295	59	2.6	4.4
III	145	44	2.7	6.1
V	89	36	1.5	4.2
	201	44	0.64	1.5
VI	89	32	1.0	3.1
	103	61	4.9	8.0
VII	103	48	0.18	0.38
VIII	83	31	1.2	3.9

a) Grafting % of V, VI, VII and VIII are based on that of the precursor IV.

とが認められた。しかし、一般にこれら合成ポリマー含有量すなわちグラフト率の増加とともに、透過性が低下する傾向にある。スルホン化膜 (VI) ではグラフト率とともに透過性が増大し、グラフト率 103% の膜は最も良好な性能を示した。これはスルホン基の強いイオン性のため、膜が水和しやすくまた静電反発により膜マトリックスの網目構造がゆるやかになったためと推測される。

ジエチルアミノ化膜 (VII) は非常に透過性が小さいが、4 級化してカチオンを導入すれば膜透過係数を大きくすることが可能である (VIII)。膜透過性は膜の親水性と密接な関連があるものと思われる。

これらの結果、コラーゲン膜へのグラフト重合により合成ポリマーとの複合化を行うと、必ずしも透過性は低下せず、元のコラーゲン膜と同程度あるいはそれ以上の性能が得られ、コラーゲンの優れた透過性能を保持した新しい医用材料の可能性が示唆された。

### 3. 4 グラフトコラーゲン膜の溶質透過性と溶質分子量との関係

既に述べたように、人工透析においては尿毒症の原因とされている中分子量物質を効率良く除去することが重要である。キュプロファン膜は中分子量物質の除去に問題があり、ビタミン B<sub>12</sub> (分子量 1355) の膜透過係数が尿素の 0.05~0.06 に低下するとされている<sup>13)</sup>。

各種グラフトコラーゲン膜中での種々の溶質透過性を表 4 にまとめた。溶質として人工透析で除去される尿素、クレアチニン、尿酸ならびに中分子量物質としてビタミン B<sub>12</sub> を用いた。

コラーゲン膜はキュプロファン膜に比べて溶質分子量の増加にともなう透過係数の低下は小さいことがわかった。MMA グラフト膜ではグラフト率の低い場合にはコラーゲン膜と同様、低下率は小さいが、グラフト率が高い場合には著しい分子量依存性を示した。HEMA グラフト膜はキュプロファンと類似している。

MAA グラフト膜は、ビタミン B<sub>12</sub> の透過性が高く、中分子量物質をも効率良く除去できるものと思われる

Table 4 Permeability of urea, creatinine, uric acid and vitamin B<sub>12</sub> through the collagen-polyacrylate graft membranes

membrane	grafting %	thickness ( $\mu\text{m}$ )	permeability ( $\times 10^{-4}\text{cm}/\text{sec}$ )				
			urea	creatinine	uric acid	VB <sub>12</sub>	$P'_{\text{VB12}}/P'_{\text{urea}}$
untreated collagen	—	21	4.7	4.4	2.3	0.95	0.20
I	79	34	6.8	2.9	2.9	1.0	0.16
	145	44	3.1	1.4	1.4	0.040	0.013
II	295	59	4.4	4.4	3.9	0.36	0.081
	145	44	6.1	3.2	3.4	1.6	0.27

る。このことは、解離基を有するポリマーでは同種イオン間の反発のため膜マトリックスを形成するファイバーのからみ合いがゆるみ溶質拡散に関与する孔径が大きくなったためと推測される。

本研究で得られた知見より、親水性ポリマーをグラフトしたコラーゲン膜は、溶質透過性の点から新しい人工腎臓用膜材料として有望であると思われ、さらに機械的強度と血液適合性の観点から検討を加えることが必要である。

#### 参 考 文 献

- 1) I. Karube, S. Suzuki, S. Kinoshita, J. Mizuguchi, *Ind. Eng. Chem. Proc. Res. Develop.*, **10**, 160 (1971)
- 2) Y. Nakamoto, I. Karube, S. Suzuki, *J. Ferment. Technol.*, **53**, 595 (1975)
- 3) 宮田暉夫, 皮革化学, **15**, 167 (1970)
- 4) C. Wang, T. Miyata, B. Weksler, A. L. Rukin, K. H. Stenzel, *Biochim. Biophys. Acta*, **544**, 555 (1978)
- 5) S. Paul, *Macromolecules*, **9**, 337 (1976)
- 6) E. Cherbuliez, A. Yagi, J. Rabinowitz, *Helv. Chim. Acta*, **44**, 1164 (1961)
- 7) 日本分析化学会編, 分析化学便覧, P 329, 丸善 (1971)
- 8) 斉藤正行, 臨床化学分析II, P 78, 東京化学同人 (1968)
- 9) 同上, P 107
- 10) 日本薬局法 (第7改正), C-674 (1961)
- 11) K. P. Rao, K. T. Joseph, Y. Nayudamma, *J. Polym. Sci. A-1*, **9**, 3199 (1971)
- 12) K. P. Rao, K. T. Joseph, Y. Nayudamma, *J. Appl. Polym. Sci.*, **16**, 975 (1972)
- 13) 今西幸雄編 バイオメディカルポリマー, P 134, 化学同人 (1980)