

生医学材料としての含フッ素ポリマーナノ粒子の調製

Preparation of Poly(methyl methacrylate-co-1H,1H,7H- dodecafluoroheptyl methacrylate) Microspheres as Biomedical Materials

研究代表者	工学部生物化学工学科	特任教授	杉山 一男 Kazuo Sugiyama
共同研究者	工学部生物化学工学科	学生	三井 翔 Syo Mitsui
	工学部生物化学工学科	教授	白石 浩平 Kohei Shiraishi
	サンユレック株式会社	取締役	久永 直克 Naokatu Hisanaga

Emulsion copolymerization of methyl methacrylate (MMA) and 1H,1H,7H- dodecafluoroheptyl methacrylate (DFHMA) yielded a series of copolymer microspheres, poly (MMA-co-DFHMA) with varying the molar ratio of the DFHMA moiety. Potassium peroxodisulfate(KPS) was used as an initiator. The molar ratio in feed was varied as MMA : MFHMA =1.0 : 0.0, 0.95 : 0.05, 0.90 : 0.10, 0.85 : 0.15 and 0.80 : 0.20. The resulting copolymer microspheres were characterized by scanning electron microscope (SEM). It was found that diameter (d) of poly(MMA-co-DFHMA)s increases from 90.0±104nm to 144.0±88nm with increasing the amount of DFHMA in feed, where d is determined by means of laser diffraction particle size analyzer. Poly(MMA-co-DFHMA)s were found to increase the contact angle of water ($\theta = 106^\circ$) and colza-oil ($\theta = 89^\circ$) compared with poly(methyl methacrylate)(PMMA). It was also confirmed from a cell culture test that the polymer films prepared from poly(MMA-co-DFHMA) showed an effective suppression of adhesiveness of HeLa cell.

1. 緒言

ポリマーナノ粒子は極めて広い表面積を有するためバルク状のポリマー材料とは異なった物性や機能を示すことからナノ粒子の状態で機能材料として応用が広がっており、エマルジョンとしてではなくポリマーナノ微粒子自体としても有用で医用・バイオ・環境・エネルギー・情報通信などのさまざまな分野で用いられている^{(1),(2)}。我々もまた生体適合性材料の開発を目的とする研究で、表面をホスファチジルコリン基^{(3),(4)}やグルコシド基⁽⁵⁾⁻⁽⁷⁾あるいはアミノ酸残基^{(8),(9)}で表面修飾したポリマーナノ粒子を調製して血漿タンパクの吸着挙動を明らかにしている。また、温度に応答してタンパク質の吸着-脱着できるポリマーナノ粒子の調製にも成功している⁽¹⁰⁾。川口らはポリマーナノ粒子をアフィニティ単体として用いバイオアッセイやバイオセパレーションに用いる研究を進めている⁽¹²⁾。

一方、フッ素樹脂コーティングに使用されるパーフルオロポリマーにはポリテトラフルオロエチレン(PTFE : $\theta = 104^\circ$)、フッ素化エチレンプロピレンコポリマー

(FEP : $\theta = 114^\circ$)、ポリテトラフルオロエチレン・パーフルオロアルキルビニルエーテル(PFA : $\theta = 110^\circ$)などがある。ここに θ は水の接触角であり、フッ素樹脂は θ 値が大きく撥水性を示しているし、油の接触角も大きく撥油性も示す。このように表面自由エネルギーが小さい⁽¹²⁾こと、すなわち、分子間凝集力が低いことがフッ素樹脂コーティングの非接着性の原因となる。

近年、人工臓器の開発研究は機能補助から機能置換を可能にすることを目的としており、人工臓器用材料の優れた力学的特性と抗血栓性さらには生体適合性が求められている。人工臓器用材料に工業用材料であるポリマー材料を用いる場合、生体適合性、特に血液適合性を確保するために材料表面層の化学構造を制御してタンパク質の吸着および細胞の接着・増殖を制御することが重要である。表面特性の制御には3つの方法が考えられている。一つはヘパリンを含むポリマー^{(13),(14)}や2-(メタクリロイルオキシ)エチルホスホリルコリン(MPC)を1成分とするコポリマー^{(15),(16)}を塗布することである。この場合、材料の力学的性質の低下は見られず、血液成分と好ましい相互作用をするも

の時間経過とともに塗布材料の剥離が起こる難点がある。二つ目はポリマー材料表面をグラフト重合により水溶性ポリマーで化学修飾してヒドロゲル層表面を創出する方法である⁽¹⁷⁻²⁰⁾。杉山らは汎用のポリエチレンテレフタレート⁽²¹⁾やポリプロピレンフィルム⁽²²⁾表面を生体適合性に優れた MPC を含むビニルポリマーで化学修飾して生医学材料に変換している⁽¹²⁾。三つ目は、材料自体にマイクロ相分離構造(海島構造ともいわれる)を導入する方法である。我々はフッ素系樹脂の非接着性と低毒性⁽¹⁵⁾に注目して新たに合成した生体適合性のある含フッ素ポリエーテルウレタンウレアのポリマーフィルム表面には血清タンパク質は単層にしか接着しないことを明らかにしている⁽²³⁾。

以上の研究の発展として、本報では抗血栓性と生体適合性の向上を目指し、新規な人工臓器用材料の開発研究を試みた。即ち、フッ素ポリマーの特性とナノ粒子の特性を合わせもった含フッ素コポリマーナノ粒子 poly(MMA-co-DFHMA) をメタクリル酸メチル(MMA)と 1H, 1H, 7H-メタクリル酸ドデカフルオロヘプチル(DFHMA)の乳化共重合から得た。含フッ素ポリマーナノ粒子およびポリマーフィルムの特性は粒径分布や接触角から確認するとともに血液適合性は HeLa 細胞の接着性から評価した。

2. 実験

2.1 試薬

2.1.1 合成試薬

1H, 1H, 7H-メタクリル酸ドデカフルオロヘプチル(DFHMA: 関東化学)は市販品をそのまま用いた。メタクリル酸メチル(MMA: 和光純薬)は常法に従って精製したのち減圧下に蒸留して用いた。過硫酸カリウム(KPS: 和光純薬)は市販品をそのまま用いた。乳化剤には界面活性剤 18%, 高級アルコール系陰イオンのアルキルエーテル硫酸エステルナトリウムの市販品をそのまま用いた。水は MILLIPORE 製 Milli-Q synthesisA10 で精製した超純水を用いた。

2.1.2 生化学的実験用試薬

Tris 緩衝液とリン酸緩衝液(PBS: SIGMA)は常法に従って所定の pH に調整して使用した。

Minimum Essential Medium (pH 7.2)は MEM powder (GIBCO) 9.6 g を 950 mL の超純水に溶かし、2.2 g の NaHCO₃ を加え、塩酸で pH を 7.2 とした後、1 L にメスアップして調製し、クリーンベンチ内で 0.22 μm フィルター-DURAPORE MEMBRANE

FILTERS (MILLIPORE)を用いてフィルター滅菌し、4°C で保存した。ウシ胎児血清(Fatal calf serum: FCS)は解凍した FCS(Cell Culture Technologies)を容器ごと 56°C の温浴につけ、30 min 加温して血清の非働化を行って調製した。放冷後、ろ紙でろ過したのち、クリーンベンチ内でフィルター滅菌して -20°C で保存した。細胞培養培地(MEM)は Minimum Essential Medium: FCS: Non essential amino acid (NEAA)を 90: 10: 1 の割合で混合して調製した。MEM は細胞培養のための培地として調製した。HeLa 細胞を培養するときは FCS を用いた。0.25% トリプシン-0.02% EDTA はトリプシン(和光純薬) 0.25 g と EDTA 0.02 g を 100 mL の PBS(pH:7.4) に溶かし、クリーンベンチ内でフィルター滅菌して -20°C で保存した。トリパンプルー溶液は PBS (pH:7.4) 100 mL にトリパンプルー 0.5 g を溶解して調製した。

2.2 乳化重合

2.2.1 MMA の乳化重合⁽²⁴⁾

かきまぜ装置、温度計、玉付き冷却管、滴下漏斗およびガス導入管を備えた 500 mL セパラブルフラスコに乳化剤 1 g を含む超純水 300 mL を入れ、次いで MMA 15 g 加える。反応系内に十分量の Ar ガスを導入しながら油浴を加温し、350 rpm でかきまぜる。油浴を 80°C にしてから KPS 1.5 g を 25 mL の水に溶解した溶液を 1 mL 加える。しばらくの後、重合が開始して水相は白濁する。30 min 後、MMA 45 g を滴下漏斗から 2 h かけて滴下する。KPS 水溶液はマイクロピペッターを使用し、1 mL を 12 min 毎に添加する操作を 10 回行う。MMA の滴下終了と同時に KPS 水溶液の添加を終える。反応終了後水浴で室温まで冷却する。反応混合物は 17G-2 のグラスフィルターで吸引濾過し、凝集物を除く。ラテックス(ポリマーミクロスフィア分散液)は、高速遠心分離機を用いて 13500 rpm, 25 min 遠心分離を行い、上澄み液を捨て超純水を加えて再分散をする操作を 5 回繰り返して PMMA ナノ粒子を得た。得られたナノ粒子は真空乾燥して用いた。

2.2.2 MMA と DFHMA の乳化共重合⁽²⁵⁾

500 mL のセパラブルフラスコに乳化剤 1 g を含む超純水 300 mL を入れ、続いて所定量の MMA と DFHMA の混合液を加える。仕込みモル比は MMA: DFHMA=0.95: 0.05~0.80: 0.20 と変化した。反応系内に十分量の Ar ガスを導入しながら油浴を

加温し、350 rpm でかきまぜる。油浴を 80°C にしてから KPS1.5 g を 25 mL の水に溶解した溶液を 1 mL 加える。しばらくの後、重合が開始し、水相は白濁する。30 min 後、MMA 45 g を滴下漏斗から 2 h かけて滴下する。KPS 水溶液はマイクロピペッターを使用して 1 mL を 12 min 毎に添加する操作を 10 回行う。MMA 滴下終了と同時に KPS 水溶液の添加を終える。反応終了後、水浴で室温まで冷却する。得られた含フッ素コポリマーナノ粒子 poly(MMA-co-DFHMA) の精製は 2.2.1 に準じて行った。

2.3 SEM-EDX の画像観察

poly(MMA-co-DFHMA) の形状と表面特性は高分解能電界放出形走査電子顕微鏡(Field Emission Scanning Electron Microscope : SEM : Hitachi 製 S-4800) を用いて測定した。また、原子組成百分率 (%) は X 線分析装置 (Energy Dispersive X-ray : EDX : HORIBA 製 EX-420) を用いて測定した。試料はカーボンテープを貼った試験台に乾燥したナノ粒子粉末を付着し、真空蒸着法により試料表面に白金パラジウム(Pt-Pd) を 15 mA, 90 sec で蒸着した。加速電圧 : 5.0~10 kV, エミッション : 10 μ A, 倍率 : 8.0 \times 10⁴ 倍とした。原子組成百分率 (%) の理論値は poly(MMA-co-DFHMA) の化学式と仕込みモル比から算出した。

2.4 粒度分布

poly(MMA-co-DFHMA) の粒径は島津レーザー回折式粒度分布測定装置 (Laser Diffraction Particle Size Analyzer : SHIMADZU 製 SALD-2200) を用いて測定した。回分セルに少量のラテックスを入れ、分散媒として超純水を加える。粒子の沈降を防ぐために攪拌プレートを用いてかきまぜながら粒径を測定した。

2.5 TG-DSC の測定

poly(MMA-co-DFHMA) の熱的性質は、熱天秤 (Thermo plus TG-DTA : Rigaku 製 TG-8120) と示差走査熱量計 (Thermo plus DSC : Rigaku 製 DSC-8230) を用いて評価した。TG 測定はアルミニウム製測定用パンに標準試薬 Al₂O₃ と測定試料のそれぞれ 5 mg を精秤し、昇温速度 5°C/min, 温度範囲 35.0°C ~ 500°C で測定した。DSC 測定はアルミニウム製測定用パンに標準試薬 Al₂O₃ と測定試料のそれぞれ 5 mg を精秤し、昇温速度 3°C/min, 温度範囲 35.0°C ~ 300°C で測定した。

2.6 ポリマーナノフィルムの作成

ポリマーフィルムは poly(MMA-co-DFHMA) 0.40 g をベンゼン 10 mL に溶解してテフロンシートをしたシャーレ上に流し込み、自然乾燥して得た。

2.7 接触角の測定

poly(MMA-co-DFHMA) ナノ粒子から得たポリマーフィルムの接触角(θ)はフィルム表面に 15 μ L の水滴あるいはナタネ油(日清キャノーラ油)を置き、温度調節器付きのエルマ製ゴニオメーター式・接触角測定機 G-1 型を用いて測定した。5 回行った測定結果のうち、最大・最小を除く平均値から接触角を決定した。

2.8 細胞接着剥離試験

細胞の接着剥離試験には HeLa 細胞を用いた。poly(MMA-co-DFHMA) から作成したポリマーフィルムは、光学フィルム固定用透明両面テープ CS-9611[日東電工(株)]をフィルムの裏面に貼り付け、4 ウェルマイクロプレート(ウェルサイズ 15 mm : FALCON)に固定した。クリーンベンチ中、1 h, UV 照射して滅菌した。ポリマーフィルム表面をオートクレーブ滅菌済のリン酸緩衝生理食塩水(PBS : 7.3) で 2 回洗浄した。HeLa 細胞は 10% ウシ胎児血清含有 Modified Essential medium(MEM)培地で培養した。その後、1 mL のトリプシン溶液(0.25 μ g/mL) を添加して HeLa 細胞を剥離した。浮遊細胞濃度を 3 \times 10⁴ cells/mL に調整後、その 1 mL をポリマーフィルムが固定されたウェル上に加え、インキュベーター中、5% CO₂ 雰囲気下、37°C, 8 h 培養した。培養後、倒立型ルーチン顕微鏡(CKX31 : OLYMPUS) を用いてフィルム表面を観察した。その後、さらに PBS でポリマーフィルムを 1 回洗浄して顕微鏡で表面を観察した。

3. 結果および考察

3.1 MMA と DFHMA の乳化共重合

乳化重合は水媒体不均一重合として工業的に最もよく用いられる方法である。MMA の乳化重合の場合、乳化剤によってほとんどの MMA モノマーはミセル内に取り込まれるが、ミセル内に取り込まれない MMA モノマーが僅かに水中にも存在する。これらミセル外に存在する遊離の MMA モノマーが水溶性開始剤 KPS の攻撃を受けて重合が始まる。2~3 量体に成長するとその成長ラジカルは水不溶となり、ミセル内に取り込まれる。成長ラジカルはミセル中

の MMA モノマーを攻撃してバルク状(塊状)で重合が続き、ポリ(メタクリル酸メチル) (PMMA) ナノ粒子ができる。即ち、MMA モノマーを内包したミセルは重合反応場であり、ほぼ初期のミセルの大きさのポリマーナノ粒子が得られる。このように乳化重合の開始反応は僅かに水中に存在する遊離モノマーがオリゴマーの成長ラジカルになることから始まるのでビニルモノマーの水への親和性が重要である。

含フッ素コポリマーナノ粒子 poly(MMA-co-DFHMA)は、開始剤 KPS、乳化剤、Ar 気流下で MMA と DFHMA の乳化共重合を行って得た。共重合反応式を Fig.1 に示し、重合結果を Table 1 にまとめる。ナノ粒子の収率は PMMA の場合を除いていずれも 70% 台であった。

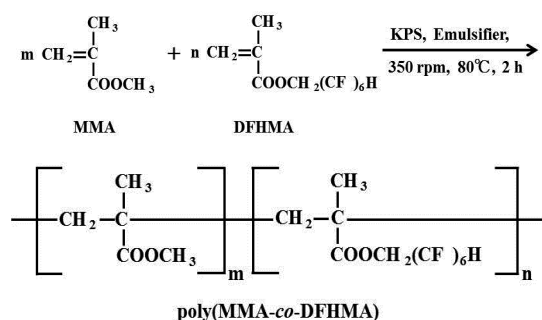


Fig.1 Emulsion copolymerization of MMA and DFHMA initiated with KPS as an initiator.

3.2 SEM-EDX の画像観察

乳化共重合により得られたポリマーナノ粒子 PMMA と poly(MMA-co-DFHMA)の粒子の形状、存在原子の定性分析、原子組成百分率(%)を SEM-EDX から確認した。SEM の画像結果と存在原子の定性分析の結果をそれぞれ、Fig.2 と Fig.3 に示し、原子組成 % の結果を Table2 にまとめる。Fig.2 に示す SEM 写真からポリマーナノ粒子はほぼ真球状であることが分かる。

また、Fig.3 の存在原子の定性分析の結果から、ポリマーナノ粒子 PMMA の表面には炭素と酸素の存在が確認され、poly(MMA-co-DFHMA)-5 場合はフッ素も存在することが確認された。また、Table 2 に示した定量分析の結果から、ポリマーナノ粒子 PMMA と poly(MMA-co-DFHMA)はともに C の% 存在率は理論値より増えており、O と F は減っていることを確認した。これは含フッ素コポリマーナノ

粒子の中心部に O と F が多く含まれているためと考えられる。

3.3 粒径分布

粒径分布の測定から含フッ素コポリマーナノ粒子の平均粒径を得た。ポリマーナノ粒子 PMMA と poly(MMA-co-DFHMA)-4 の粒径分布を Fig.4 に示す。他のナノ粒子についても同様のベル型分布が見られた。粒径分布から得られたナノ粒子の粒径を Table 1 にまとめる。粒径は $90.0 \pm 104 \sim 144.0 \pm 88$ nm であり、Fig.5 に示すように仕込み DFHMA 量の増大とともに大きくなっていることが分かった。これは仕込み DFHMA 含量が増えると乳化重合系における MMA モノマー油滴中に DFHMA モノマーが取り込まれ、油滴が大きくなるためと考えられる。ここに乳化重合は開始剤 KPS から生成する開始種 $\cdot\text{OS}\bar{\text{O}}_3\text{K}^+$ が開始種となり水中に溶存する MMA を攻撃して重合を開始し、成長する MMA オリゴマーが水中に分散できずに、DFHMA を含む MMA の油滴中に取り込まれ重合が進行してナノ粒子となる。したがって、DFHMA を多く含む MMA 油滴からはより大きなナノ粒子ができることになる。

3.4 TG-DSC の測定

成型加工の際の適正加工温度を知る目的でコポリマーナノ粒子 poly(MMA-co-DFHMA)の熱的性質を TG-DSC を用いて、ガラス転移温度(Tg)とともに熱分解温度(Tdec)を測定した。Fig.6 に示す TG 測定結果から DFHMA 量の増加とともに Tdec は上昇することが分かった。poly(MMA-co-DFHMA)(Fig.6 B)の場合、熱分解は $T_{\text{dec}} = 308.3^\circ\text{C}$ で PMMA(A)の $T_{\text{dec}} = 303.5^\circ\text{C}$ より僅かではあるが高温側にあることから熱安定性が向上していることが分かる。このように Tdec が DFHMA 量の増加とともに高温側にシフトするのは DFHMA がもつ C-F 結合の双極子-双極子相互作用が強いことによると考えられる。また、Fig.7 に示す DSC の測定結果から、仕込み DFHMA 量の増加とともに Tg は低温側にシフトした。Tg が DFHMA 量の増加とともに低下するのは融点降下に起因すると考えられる。poly(MMA-co-DFHMA)と PMMA の Tg は、それぞれ $T_g = 111.4^\circ\text{C}$ と $T_g = 121.8^\circ\text{C}$ であったことから、フィルム形成は Tg 以上の温度で行うことになる。Td と Tg に及ぼす仕込み DFHMA 量の影響は Fig.8 に示すように DFHMA の量の変化に直線的に対応していることが分かる。

Table 1 Results and characterization of emulsion copolymerization^{*1)2)} of MMA and DFHMA.

poly(MMA-co-DFHMA)	Molar ratio in feed		KPS	Particle Yield	d ^{*3)}	Tg ^{*4)}	Td ^{*5)}	Contact angle(deg)	
	MMA (m)	DFHMA (n)						Water	Colza-oil
1	1 : 0	600	5.6	48.8	91.0 ± 105	303.5	121.9	55.3	30.5
2	0.95 : 0.05	500	5.6	77.2	90.0 ± 104	308.3	111.4	83.9	44.1
3	0.90 : 0.10	400	5.6	72.2	135.0 ± 93	312.9	102.4	91.0	43.3
4	0.85 : 0.15	300	5.6	77.1	144.0 ± 88	316.9	93.0	92.8	46.5
5	0.80 : 0.20	300	5.6	72.0	129.0 ± 92	318.0	91.4	91.1	40.6

* 1 Reaction condition : 80°C, 2 h, 350 rpm, H₂O 300 mL, KPS 5.6 mmol, under Ar gas.

* 2 Synthetic detergent "Family Fresh" (18% anionic fatty alcohol : Kao) : 1g

* 3 Average particle diameter.

* 4 Thermal decomposition temperature.

* 5 Glass transition temperature.

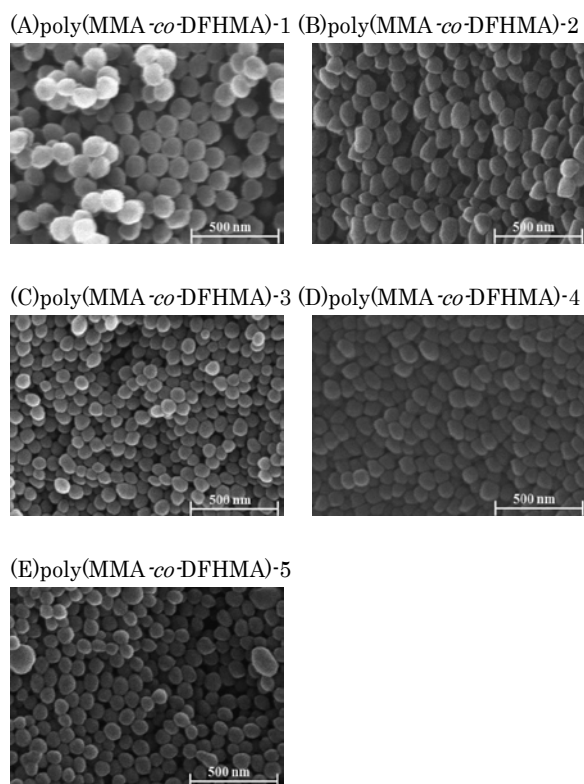


Fig.2 SEM image of polymer microspheres poly (MMA-co-DFHMA)-1~5, 8×10^4 .

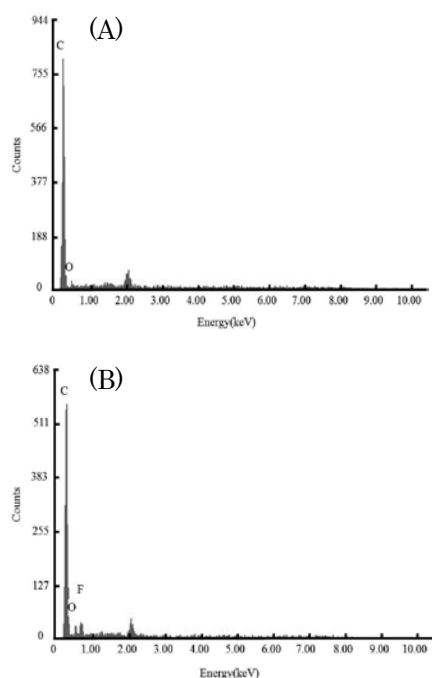


Fig.3 Qualitative analysis of (A) : PMMA and (B) : poly(MMA-co-DFHMA)-5.

Table2 Quantitative analysis of PMMA and poly(MMA-co-DFHMA).

	Percentage atomic composition(At%)			
	PMMA		P(MMA-co-DFHMA)	
	Calc	Anal	Calc	Anal
C	71.43	96.86	65.94	90.17
O	28.57	3.14	24.46	5.71
F	—	—	9.60	4.12

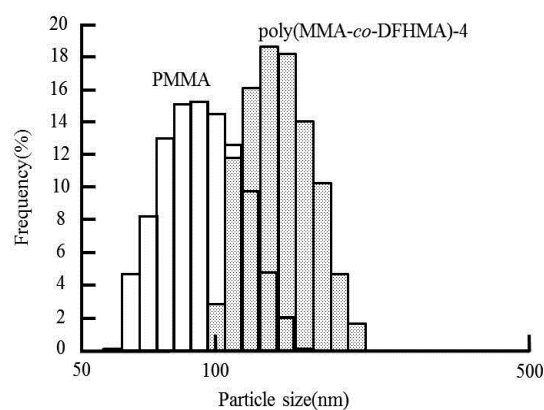


Fig.4 Comparison of particle size of PMMA with poly(MMA-co-DFHMA)-4.

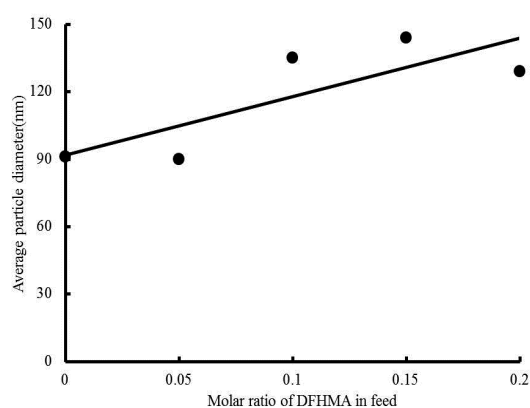


Fig.5 The effect of molar ratio of DFHMA on the average particle diameter of poly(MMA-co-DFHMA).

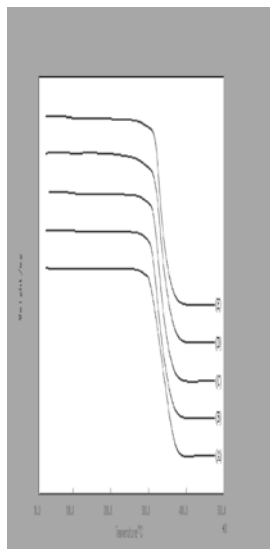


Fig.6 The thermal decomposition temperature (T_{dec}) of poly(MMA-co-DFHMA). (A):PMMA, (B) : poly(MMA-co-DFHMA)-2, (C) :-3, (D) :-4, (E) :-5.

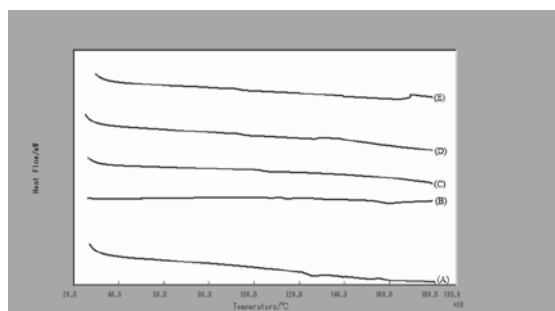


Fig.7 The glass transition temperature(T_g) of poly(MMA-co-DFHMA). (A):PMMA, (B):poly(MMA-co-DFHMA)-2, (C):-3, (D):-4, (E):-5.

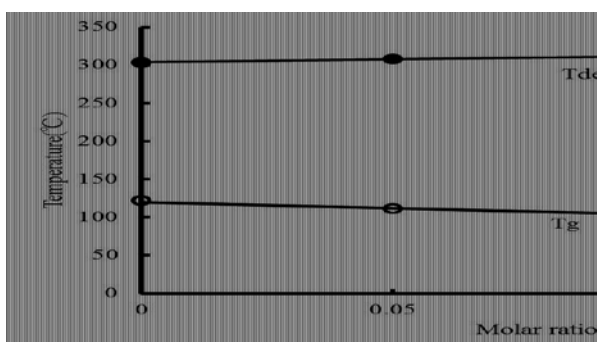


Fig.8 The effect of molar ratio of DFHMA on T_{dec} and T_g .

3.5 接触角の測定

poly(MMA-co-DFHMA)フィルムの水とナタネ油の接触角の測定結果を Table1 にまとめる. DFHMAの仕込みモル比率の増加とともに水の接触角は $55 \sim 92^\circ$ に大きくなり, ナタネ油の接触角も $30.5 \sim 46.5^\circ$ に上昇した. 仕込み DFHMA 量を増加すると水, 油ともに接触角が上昇することは DFHMA セグメントのもつ高い疎水性による. このことからポリマーナノ粒子 poly(MMA-co-DFHMA)から調製したポリマーフィルムは高い疎水能力があるため, 細胞非接着表面であることが期待できる. すなわち, 血液細胞である血小板の非接着→非粘着表面→抗血栓性表面であることが期待できる.

3.6 細胞接着剥離試験

poly(MMA-co-DFHMA)フィルムの抗血栓性を調べるため, HeLa 細胞の接着(粘着)⇔剥離試験を行った. ここに, HeLa 細胞は接着性が高いため血液細胞である血小板の代替として用いた. poly(MMA-co-DFHMA)フィルムに HeLa 細胞を 3.0×10^4 cell/mL 播種し, 1 回洗浄を行った. PMMA および poly(MMA-co-DFHMA)フィルム上への HeLa 細胞の接着状況の顕微鏡写真を Fig.9 に示す. 左が細胞培養後, 右が洗浄後である. PMMA フィルムと poly(MMA-co-DFHMA)フィルム剥離率は, それぞれ 62.9%と 84%であった. 後者の場合, HeLa 細胞が接着し難いことから抗血栓性が期待でき, 生医学材料としての応用が期待できる.

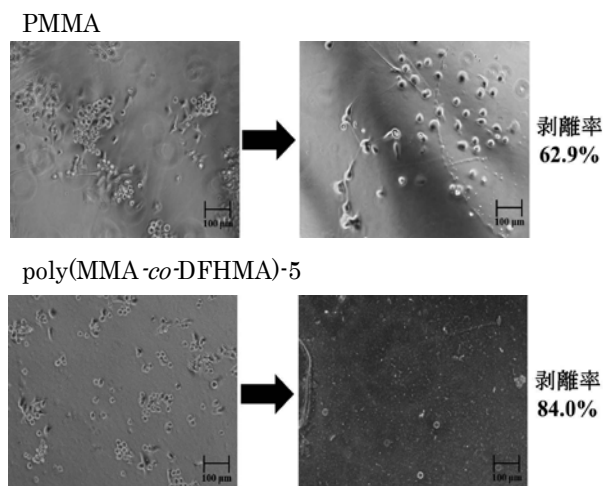


Fig.9 The results of HeLa cell adhesion-desquamation test on PMMA and poly(MMA-co-DFHMA)-5 films.

4. まとめ

1) 粒度分布から、フッ素系ビニルモノマーDFHMAの仕込みモル比を変化することによってコポリマーナノ粒子 poly(MMA-co-DFHMA)の粒径が調節可能であることを確認した。

2) 接触角(θ)測定から、poly(MMA-co-DFHMA)フィルムの高い疎水性を確認した。

3) 血小板の代替としての HeLa 細胞を用いた細胞接着剥離試験の結果から、poly(MMA-co-DFHMA)フィルムにはほとんど細胞が接着していないことを認めた。

以上の結果から、乳化共重合で得た含フッ素コポリマーナノ粒子 poly(MMA-co-DFHMA)から作成したポリマーフィルムは血液細胞に非接着性を示す表面であることがわかった。

参考文献

- (1) 西 敏夫, 中嶋 健, 「高分子ナノ材料」, P6-9, 56-62, 共立出版, (2005).
- (2) 液晶若手研究編, 「液晶ディスプレイの最先端」, P147, シグマ出版 1, (1996).
- (3) K. Sugiyama, K. Shiraishi, K. Ohga, H. Shirahama, H. Tamai, K. Kikukawa, H. Yasuda, *Polym. J.* 25, 521-527(1993).
- (4) H. Sugiyama, K. Ohga, H. Aoki, *Macromol. Chem. Phys.*, 196, 1907-1916(1995).
- (5) K. Sugiyama, K. Ohga, H. K. Kikukawa, *Macromol. Chem. Phys.*, 195, 1341-1352 (1994).
- (6) K. Sugiyama, T. Oku, *Polym. J.* 27, 179-188 (1995).
- (7) 杉山一男, 奥 晃政, 大賀幸二, 高分子論文集, 53, 115-122(1996).
- (8) K. Shiraishi, T. Ohnishi, K. Sugiyama, K. Okada, O. Matsuo, *Chem. Lett.*, 1997, 863-864.
- (9) K. Shiraishi, T. Ohnishi, K. Sugiyama, *Macromol. Chem. Phys.*, 199, 2023-2028 (1998).
- (10) K. Sugiyama, S. Mitsuno, K. Shiraishi, *J. Polym. Sci.:Part-A : Polym. Chem.*, 35, 3349-3357(1997).
- (11) S. Oba, M. Hatakeyama, H. Hand, H. Kawaguchi, *Bioconjugate Chem.*, 16, 551(2005)
- (12) D. J. Lyman, K. G. Klein, *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 23, 120(1970).
- (13) M. C. Tanzi, M. Levi, M. Muttoni, G. Tieghi, R. Fumero, *Adv. Biomater. (Biomater. Clinic. Appl.)*, 7, 427(1987).
- (14) S. Nagaoka, T. Kikuchi, Y. Mori, *Jpn. Patent* 82, 119, 756(1982).
- (15) K. Ishihara, H. Hanyuda, N. Nakabayashi, *Biomaterials*, 16, 873, (1995).
- (16) K. M. DeFife, J. K. Yun, A. Azeez, S. Stack, K. Ishihara, N. Nakabayashi, E. Colton, J. M. Anderson, *J. Biomed. Mater. Res.*, 29, 431 (1995).
- (17) P. T. Cahalan, M. Verhoeven, *U.S. Patent* 52, 29, 172(1993).
- (18) S. Q. Lin, Y. Ito Y. Imanishi, *J. Biomed. Mater. Polym.*, 1, 111(1989).
- (19) C. Nojiri, T. Okano, H. A. Jacobs, K. D. Park, S. F. Mohammad, D. B. Olsen, S. W. Kim, *J. Biomed. Mater. Res.*, 24, 1151(1990).
- (20) C. H. Bamford, K. G. Al-Lamee, Y. P. Yianni, M. C. Wiles, WO-93/05081(1993)
- (21) K. Sugiyama, K. Kato, M. Kido, K. Shiraishi, K. Ohga, K. Okada, O. Matsuo, *Macromol. Chem. Phys.*, 199, 1201(1998).
- (22) K. Sugiyama, T. Matsumoto, Y. Yamazaki, *Macromol. Mater. Eng.*, 282, 58(2000).
- (23) 杉山一男, 秋田修平, 友井陽子, 花木香織, 白石浩平, 上田健司, 日本化学会誌, 1997, 139.
- (24) 大津 隆行, 木下 雅悦, 「高分子合成の実験法」, P149-150, 化学同人, (1972).
- (25) 杉山一男, 中村豪希, 白石浩平, 久永直克, 近畿大学次世代基盤技術研究所報告, 2, 37(2011).