

感温性ポリ[N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド-ジメチルシロキサン] ブロックコポリマーのキャラクタリゼーション†

谷川 将行* 白石 浩平** 杉山 一男***

Characterization of Thermo-Responsive Poly [N-(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide— Dimethylsiloxane] Block Copolymers

by

Nobuyuki TANIGAWA *, Kohei SHIRAIISHI ** and Kazuo SUGIYAMA ***

Block copolymers, Poly (HPMA-b-DMS)–1 ~ 7, were obtained from polymerization of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) initiated with polydimethylsiloxane (PDMS) type of azo-initiator [4,4'-azobis (polydimethylsiloxane)–4-cyanopentanoate (azo-PDMS)]. From XPS measurements of freeze dried samples, the hydrophilic PHPMA segment was found to migrate to the surface of Poly (HPMA-b-DMS) films in water. Poly (HPMA-b-DMS) showed lower contact angle ($\theta = 54^\circ \sim 100^\circ$) than PDMS itself ($\theta = 103^\circ$). It was also found that the contact angle of block copolymers was changed in response to change in temperature, i.e., $\theta = 64^\circ \sim 79^\circ$ at 40°C and $\theta = 54^\circ \sim 69^\circ$ at 20°C for Poly (HPMA-b-DMS). The amount of adsorption of albumin on the Poly (HPMA-b-DMS) film was depressed at 20°C compared to the case at 40°C . For the purpose of an application to a thermo-responsive drug delivery system, copolymer hydrogel Gel (HPMA-b-DMS) was also prepared by radical copolymerization of HPMA and N,N'-ethylenebisacrylamide initiated with azo-PDMS.

Key words : Block copolymers, Polydimethylsiloxane, N-(2-Hydroxypropyl) methacrylamide, Thermo-responsive, Copolymer hydrogel, Swelling-shrinking change

1 緒 言

シリコン樹脂は生理学的に不活性とされ、医用材料として有用であるがトリグリセリドを吸収しやすいことや表面に吸着した血漿タンパク質を変性させ易いことから、血液と接触する部位には使用されない。しかし、線状のシリコンであるポリジメチルシロキサン (PDMS) にアラミドを組み込んだブロックコポリマー^{1), 2)}やポリビニルアルコール/PDMS グラフトコポリマー³⁾では生体適合性が改善することが報告されている。我々も、PDMS 系ポリマーアゾ開始剤を用いて得た PDMS を疎水性セグメントとし、ポリ (2-ヒドロキシエチルメタクレート)、ポリ [(2, 3-ジヒドロキシプロピル) メタクレート] あるいはポリ (1-メタクリロイルオキシズルシトール) を親水性セグメントとする一連のブロックコポリマーがタンパク質の吸着を抑制することを見いだしている。⁴⁾また、ポリエーテルウレタン尿素の主鎖にテトラメチルジシロキサン部を組み込むと血清中のアルブミンが選択的に吸着して不活性の表面を形成すること⁵⁾さらにリン脂質の極性頭頂部をもつポリ [2-(メタクリロイルオキシ) エチルホスホリルコリン] と PDMS のブロックコポリマーはタンパク質の吸着を抑制するとともに血小板の粘着・

活性化を抑制することを報告している。⁶⁾

一方、ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) は水溶液中で温度変化にตอบสนองして可逆的に coil-globule 転移を示すことから、そのポリマーヒドロゲルの膨潤-収縮の変化が薬物送達システム (DDS) に応用されている。⁷⁻⁹⁾我々は、人工血漿^{10), 11)}や酵素のキャリアー¹²⁻¹⁴⁾あるいは抗がん剤ダウノマイシンを担持したりソゾーム指向性の DDS¹⁵⁻¹⁶⁾などバイオメディカル分野に応用されているポリ [N-(2-ヒドロキシプロピル) メタクリルアミド] (PHPMA) に所定量のメタクリル酸メチルやメタクリル酸ブチルセグメントを導入したコポリマーは感温性を示すことを見出した。¹⁷⁾また、PHPMA セグメントで表面修飾したポリメタクリル酸メチル微粒子へのタンパク質の吸着量が温度変化にตอบสนองすることを見いだしている。¹⁸⁾

本報では、新しい医用材料として生体適合性に優れかつ温度応答性を示す PDMS 系ブロックコポリマーの開発を目的に、PDMS 系マクロアゾ開始剤 azo-PDMS を用いた HPMA のラジカル重合から両親媒性を示すブロックコポリマー Poly (HPMA-b-DMS) とポリマーヒドロゲル Gel (HPMA-b-DMS) を合成し、表面解析を含むキャラクタリゼーションとタンパク質の吸着挙動を検討した。

† 原稿受理 平成 17 年 9 月 28 日 Received Sep. 28, 2005

* マナック(株)研究所 〒721-0956 福山市箕沖町, Res. Lab., Manac Incorporated, Minooki-cho, Fukuyama, 721-0956

** 近畿大学大学院システム工学研究科生物化学システムクラスター 〒739-2116 東広島市高屋うめの辺, Cluster of Biotech. and Chem. Systems, Graduate School of Systems Eng., Kinki Univ., Takaya, Higashihiroshima, 739-2116

*** 正 会 員 近畿大学大学院システム工学研究科生物化学システムクラスター 〒739-2116 東広島市高屋うめの辺, Cluster of Biotech. and Chem. Systems, Graduate School of Systems Eng., Kinki Univ., Takaya, Higashihiroshima, 739-2116

2 実 験

2・1 試薬

マクロアゾ開始剤 azo-PDMS は和光純薬から提供された VPS-0501 ($M_n: 3 \sim 4 \times 10^4$) をそのまま用いた。N-(2-ヒドロキシプロピル) メタクリルアミド (HPMA) は文献¹⁹⁾に従って合成し、アセトンから再結晶した。mp: 67 ~ 68°C。元素分析値: $C_7H_{13}O_2N = 143.186$ としての計算値 C: H: N = 58.72%: 9.15%: 9.78%, 実測値 C: H: N = 58.37%: 9.03%: 9.58%。N,N'-エチレンビスアクリルアミド (EBAAm: Fluka) はそのまま用いた。ウシ血清アルブミン (Alb: 凍結乾燥品: Sigma Chemical), ヒト血清 γ -グロブリン (Glo: 和光純薬) はそのまま用いた。水は東洋科学産業製 Aquarius GS-20N を用いて精製して用いた。

2・2 ラジカル重合

前報²⁰⁾に準じて、HPMA と azo-PDMS 中のジメチルシロキサン (DMS) 単位の仕込みモル比を HPMA: DMS = 0.75: 0.25 ~ 0.05: 0.95 としてベンゼン: メタノール (60: 40 vol.%) 混合溶媒 15 mL に溶解してガラス製重合管に入れた。重合管は液体窒素浴で冷却-脱気-窒素置換を繰り返したのち、減圧下で溶封した。重合は 60°C, 20h ふりまぜながら行い、重合管内容物を多量のアセトニトリル中に注入して一連のブロックポリマー Poly (HPMA-b-DMS) を析出させた。重量平均分子量 (M_w) と数平均分子量 (M_n) は Tosoh TSK-GEL α 4000, 3000, 2500 をカラムとし、検出器に Shimadzu RID-6A を用いた GPC 測定から求めた。ここに、ポリエチレンオキサイド (PEO) を標準物質とし、メタノールを移動相とした。極限粘度 $[\eta]$ は Ubbelohde 型粘度計を用いて、ベンゼン: メタノール (60: 40 vol.%) 中、25°C で測定した。Poly (HPMA-b-DMS) の共重合組成比 ($p: q$) は元素分析の N 値から求めた。

2・3 Gel (HPMA-b-DMS) の合成

HPMA, azo-PDMS 中の DMS 成分量および架橋剤 EBAAm の仕込みモル比を HPMA: DMS: EBAAm = 0.75: 0.25: 0.01 とし、ベンゼン: メタノール (60: 40 vol.%) 混合溶液 15 mL 中、2・2 項と同様に重合して得た。ポリマーヒドロゲルは熱エタノールで洗浄を繰り返して精製した。

2・4 製膜

Poly (HPMA-b-DMS) 0.30g を含むベンゼン: メタノール (60: 40 vol.%) 混合溶媒 15 mL を水銀浴上 (直径 60mm) に展開し、常温常圧で溶媒を蒸散させたのち、40°C, 10h 加熱真空乾燥して厚さ約 0.2mm のポリマーフィルムを得た。凍結乾燥試料はフィルムを 25°C の水に 24h 浸漬したのち、-78°C で凍結させ、東京理器機械凍結乾燥機 FD-1 で凍結乾燥して調製し、X 線光電子分光 (XPS) 測定用試料とした。

2・5 タンパク質の吸着実験

タンパク質の吸着実験は前報²⁰⁾に準じ、Poly (HPMA-b-DMS) でコーティングしたガラスビーズを用いて行った。pH は Alb 分子および Glo 分子が最もコンパクトな

形態をとるそれぞれの等電点付近 (Alb: pH5.6, Glo: pH6.2) とし、タンパク質の初期濃度を 50 mg L^{-1} として行った。タンパク質の吸着量は吸着平衡に達する時間を 2h としたときの残存するタンパク質量を Lowry 法²¹⁾で定量して求めた。

2・6 膨潤度の測定

乳鉢で、50 ~ 100 メッシュに粉碎した Gel (HPMA-b-DMS) 0.2g を内径 0.60cm, 長さ 30cm のガラス管に入れ、水を加えたのち所定温度の恒温槽中、垂直に静置して所定時間毎に膨潤した長さを測定した。膨潤度は次式より求めた。

$$S = \frac{L_{pH_2O} - L_p}{L_p}$$

S : 膨潤度
 L_{pH_2O} : 膨潤後の長さ
 L_p : 膨潤前の長さ

2・7 機器測定

示差走査熱量計 (DSC) 測定は Rigaku DSC-8230B を使い、含水試料 (ポリマー: 5mg + 水: 10mg) を昇温速度 $2^\circ \text{C min}^{-1}$ で測定した。XPS 測定は Shimadzu ESCA 750 を使用し、試料をステンレススチール製ホルダー上にのせ、 $6.7 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ の真空下、光電子放出角 90° とし $\text{MgK}\alpha$ (1253.6eV) で測定した。

3 結果と考察

3・1 ブロックコポリマーの合成

シリコン樹脂の生体適合性の向上を目的に、水溶性の PHPMA セグメントを含む親水-疎水性ブロックコポリマー Poly (HPMA-b-DMS)-1 ~ 7 を、マクロアゾ開始剤 azo-PDMS を用いて合成した (Fig. 1)。重合とキャラクタリゼーションの結果を Table 1 にまとめる。いずれの Poly (HPMA-b-DMS) も 80% 以上の収率で得られ、元素分析の N 含量からコポリマーの組成比 $p: q$ を求めたところほぼ仕込みモル比を反映していた。また、 $M_w = 8.0 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$ ($M_w/M_n = 1.20 \sim 1.90$) であり、平均分子量が大きいコポリマーでは多分散であったが、 $M_w = 1.8 \times 10^4$ 以下のコポリマーでは、単分散に近いコポリマーが得られた。極限粘度は、 $[\eta] = 0.42 \sim 0.14 \text{ dL g}^{-1}$ と PDMS セグメント (q) の増加とともに小さくなった。Poly (HPMA-b-DMS) の性状は、 q 値に依存し、 $q \leq 0.47$ では白色粉末、 $0.76 < q < 0.90$ では白色でゴム弾性を示し、 $q = 0.95$ では透明なゴム状であった。また、25°C における Poly (HPMA-b-DMS) の有機溶媒に対する溶解性はアルコールには可溶でアセトニトリルには不溶であるが、アセトンやテトラヒドロフラン中ではゲル状に膨潤した。

3・2 XPS 測定

ポリマー材料表面では、環境に依存して表面の分子鎖の配向状態が変化する。また、表面自由エネルギーが異なる成分からなる多相系ポリマー材料では界面自由エネルギーを最小となるように再編成²²⁾されることから、Poly (HPMA-b-DMS) の表面状態を知るために、コポリマーフィルムを水に浸漬したときの親水性基の分布を XPS 測定で表面解析した。典型例として、Poly (HPMA-b-DMS)-2 の C_{1s} , O_{1s} , N_{1s} および Si_{2p} のシグナルを Fig. 2



Poly(HPMA-b-DMS)	M : Si ^{a)}	Yield %	Elemental analysis			p : q ^{b)}	$\frac{[\eta]^c}{\text{dL g}^{-1}}$	$\frac{\text{Mw}^d)}{\times 10^{-4}}$	$\frac{\text{Mn}^d)}{\times 10^{-4}}$	Mw/Mn	Property
PHPMA	1.00 : 0		C(%)	H(%)	N(%)						
1	0.75 : 0.25	87.9	55.12	9.68	8.62	0.76 : 0.24	0.42	8.0	4.2	1.90	: White powdery
2	0.50 : 0.50	87.6	50.46	9.37	6.87	0.53 : 0.47	0.22	3.8	2.3	1.67	
3	0.25 : 0.75	80.2	42.92	9.08	4.38	0.24 : 0.76	0.17	1.7	1.4	1.24	: White rubbery
4	0.20 : 0.80	81.9	40.81	8.53	3.78	0.20 : 0.80	0.16	1.8	1.5	1.21	
5	0.15 : 0.85	88.9	38.83	8.62	2.87	0.14 : 0.86	0.14	1.7	1.4	1.21	
6	0.10 : 0.90	89.2	30.91	8.33	2.09	0.10 : 0.90	0.14	1.6	1.4	1.20	
7	0.05 : 0.95	90.5	34.82	8.19	1.25	0.05 : 0.95	0.14	1.5	1.1	1.30	: Transparent rubbery
PDMS	0 : 1.00					0 : 1.00					

a) M : Si represents the molar ratio of HPMA : DMS in feed.
b) Molar ratio (p : q) in Poly(HPMA-*b*-DMS) was calculated from N of content elemental analysis.
c) Measured at 1.0 g dL⁻¹ in benzene : methanol (60 : 40 vol.%) at 25°C.
d) Condition ; solv. : methanol, stand. : PEO, detector : RI, at 30°C.

Poly(HPMA-b-DMS)	p : q ¹⁾	N/C × 10 ³		
		from XPS		from EA ²⁾
		Vacuum dried	Freeze dried	
1	0.76 : 0.24	55.3	101.4	156.4
2	0.53 : 0.47	55.6	80.6	136.1
3	0.24 : 0.76	17.9	30.2	102.1

a) See Table 1.
b) EA represents elementary analysis.

3・3 DSC 測定

HPMA とアルキルメタクリレートとのランダムコポリマーは、水中で温度変化にตอบสนองして、可逆的な random coil (低温) — globule (高温) の相転移することはすでに報告した。¹⁷⁾ 本報におけるブロックコポリマーはポリアルキルメタクリレートより疎水性の強い PDMS セグメントを含むので Poly (HPMA-b-DMS) -1 ~ 4 について温度ตอบสนอง性の有無を熱分析から検討した。Fig. 3 はブロックコポリマー 5mg に水 10mg を加え、10℃、24h 静置した後、昇温時に測定した DSC サーマグラムである。いずれも吸熱ピークが認められ random coil-globule の相転移をすることがわかる。また、 $p = 0.20, 0.24, 0.53, 0.76$ と増大するとともにピークトップから求めた相転移温度は 15.0℃、27.2℃、32.1℃、40.7℃と上昇した。このように親水性セグメント量の増加とともに相転移温度が上昇する現象は HPMA とアルキルメタクリレートのコポリマーについても認められる。¹⁷⁾ なお、本研究における DSC 測定の結果から冷却時に発熱ピークが認められず相転移の可逆性は不明であるが、HPMA とアゾベンゼン基を含むメタクリレートとのランダムコポリマーでは大きなヒステリシスを示すものの相転移に可逆性を認めている。²⁵⁾ 本研究においてもヒステリシスを考慮して 1 回目の測定後、10℃、24h 静置し、再度測定を行い、同じ DSC サーマグラムを得たことから、Poly (HPMA-b-DMS) の水中における相転移は可逆的におこるものと考えられる。

3・4 接触角の測定

材料表面のぬれ性は生体適合性を知るうえで重要な因子であるので水に浸漬した後、凍結乾燥した Poly (HPMA-b-DMS) フィルム表面のぬれ性を 20℃と 40℃における接触角から評価した。結果を Fig. 4 に示す。シリコン樹脂 ($p = 0$) の接触角は 103°であったが、PHPMA セグメント量 (p) が増すにしたがって接触角は低下し、表面のぬれ性が向上した。このことは DSC 測定結果に対応しており、親水性成分 p 値の増加とともに相転移温度は上昇し、ぬれ性も大きくなる。また、 $p \geq 0.2$ では、20℃における接触角は 40℃の場合より低いことから、

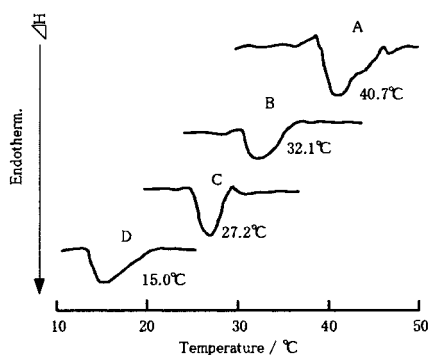


Fig. 3 DSC thermograms of Poly (HPMA-b-DMS) in water; Poly (HPMA-b-DMS) : 5mg, H₂O : 10mg.

- A: Poly (HPMA-b-DMS)-1,
B: Poly (HPMA-b-DMS)-2,
C: Poly (HPMA-b-DMS)-3,
D: Poly (HPMA-b-DMS)-4.

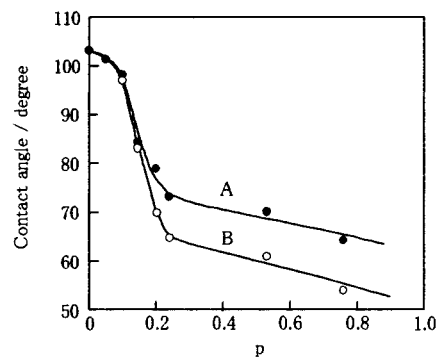


Fig. 4 Effect of PHPMA unit (p) on the contact angle of freeze dried of Poly (HPMA-b-DMS) film.

- A: 40℃,
B: 20℃.

20℃では水との界面において PHPMA セグメントの水素結合が発達して親水性となり、ぬれやすくなるが、40℃では PHPMA セグメントは globule 構造となって疎水性相互作用の方が支配的となりぬれ性が低下することがわかる。

3・5 タンパク質の吸着

ポリマー材料を生体に埋植したとき初期に生起するタンパク質と材料表面の相互作用が重要なことから血漿タンパク質の吸着挙動を Poly (HPMA-b-DMS) でコーティングしたガラスビーズを用いて検討した。すでに、我々はポリ (1-メタクリロイルオキシズルシトール) と PDMS のブロックコポリマーがタンパク質の吸着や血小板の粘着と活性化を抑制すること、および、PHPMA セグメントで表面修飾したポリメタクリル酸メチル微粒子へのアルブミン (Alb) の吸着量は温度にตอบสนองして変化することを報告している。¹⁸⁾ 本報では、Poly (HPMA-b-DMS) の血液適合性を Alb とグロブリン (Glo) の吸着挙動から評価した。このとき、吸着温度を 20℃および 40℃としたときの結果を PDMS の場合とともに Fig. 5 にまとめる。比較のため、PDMS へのタンパク質の吸着挙動も示した。Fig. 5 から Poly (HPMA-b-DMS) は PDMS に比べタンパク質の吸着量をかなり抑制していることがわかる。また、いずれの材料表面にも Alb よりも Glo の吸着量の方が多かった。この現象は PDMS、ポリエーテルウ

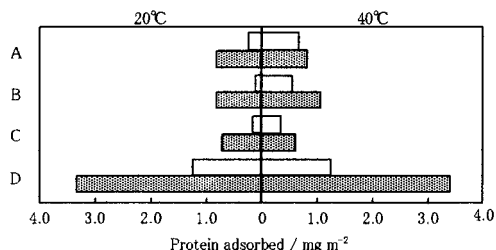


Fig. 5 Amount of protein adsorbed on Poly (HPMA-b-DMS) : [Protein]₀ = 50mg L⁻¹,

- A: Poly (HPMA-b-DMS)-1, $q = 0.24$,
B: Poly (HPMA-b-DMS)-2, $q = 0.47$,
C: Poly (HPMA-b-DMS)-3, $q = 0.76$,
D: PDMS, $q = 1$,
□ : Alb, pH 5.6, ▨ : Glo, pH 6.2, 2h.

レタン尿素, ポリエーテルウレタンナイロンの場合にも認められている。²⁶⁾これは, 1) タンパク質分子の疎水性の程度の差, 2) Alb 分子より Glo 分子の方が大きくアンカリングセグメントの数が多いこと,²⁷⁾3) コポリマー表面に吸着したタンパク質分子の配向の差²⁶⁾によると考えられる。さらに, 20℃におけるコポリマーへのタンパク質の吸着量は 40℃の場合に比べ抑制されることが分かった。特に, Alb の場合に顕著であった。これは上述のように, 40℃の場合に比べて, 20℃では PHPMA によるヒドロゲル層が発達しているためである。

3・6 Gel (HPMA-b-DMS) の温度応答挙動

Poly (HPMA-b-DMS) は温度応答性を示し, かつ生体適合性も有することから医用材料としての応用が考えられる。本報では, 新規な感温性 DDS のキャリアー分子としての有効性を検討するために, ポリマーヒドロゲル Gel (HPMA-b-DMS) を合成した。Fig. 6 は, 20℃と 40℃でパルス的に温度変化させたときのゲルの膨潤度 (S) 変化である。20℃と 40℃ではそれぞれ $S = 2.2$ と $S = 1.8$ となり, 20℃では膨潤, 40℃では収縮する可逆的な膨潤—収縮変化することを認めた。なお, DSC 測定から線状のブロックコポリマーでは相転移の可逆性が認められなかったが, このゲルの温度に応答した挙動は Poly (HPMA-b-DMS) の水中における相転移が可逆的であることを意味するものと考えた。

4 結 論

以上のことから次のことが明らかになった。

- (1) Poly (HPMA-b-DMS) は, PHPMA セグメントのモル比 p の増加にともない親水性が向上した。また, $p \geq 0.2$ において, 表面のぬれ性は温度応答性を示した。
- (2) Poly (HPMA-b-DMS) は水中で相転移を示し, 相転移温度は PDMS セグメントのモル比 q の増加にともない低下した。
- (3) Poly (HPMA-b-DMS) への血漿タンパク質の吸着は PDMS の場合より抑制された。また, 温度に応答して親水性—疎水性が変化することに対応して Alb の吸着量は 40℃の場合より 20℃で低下した。
- (4) Gel (HPMA-b-DMS) は 20℃と 40℃において可逆的に膨潤—収縮変化を示した。

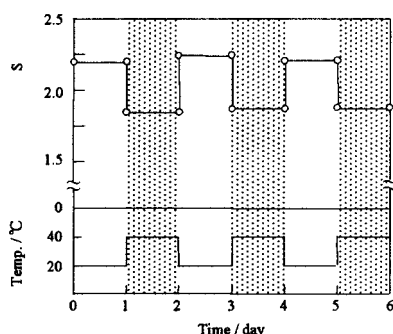


Fig. 6 Pulsatile swelling change of Gel (HPMA-b-DMS) in response to stepwise temperature change at 20℃ and 40℃, 24h.

- (5) 以上のことから, タンパク質を吸着・変性させやすいシリコン樹脂を医用材料として使用する場合, PHPMA セグメントを導入することは有用であることを認めた。

参 考 文 献

- 1) T. Furuzono, A. Kishida, M. Akashi, I. Maruyama, T. Mitazaki, Y. Koinuma and T. Matsumoto, "Development of a novel biomaterial alamid-silicone resin Studies of gas-permeability and blood-compatibility", The Japanese Journal of Artificial Organs, Vol.22, No.2, pp.370-375 (1993).
- 2) T. Furuzono, E. Yashima, A. Kishida, I. Maruyama, T. Matsumoto and M. Akashi, "A novel biomaterial : poly (dimethylsiloxane)-polyamide multiblock copolymer I. synthesis and evaluation of blood compatibility", Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition, Vol.5, No.1/2, pp.89-98 (1993).
- 3) Y. Tezuka, S. Matsui, A. Fukushima, M. Miya, K. Imai, K. Kataoka and Y. Sakurai, "Surface structure and blood compatibility of poly (vinyl alcohol)/poly (dimethyl-siloxane) graft copolymers", Japanese Journal of Polymer Science and Technology, Vol. 42, No.10, pp.629-634 (1985).
- 4) K. Sugiyama, N. Tanigawa and K. Shiraishi, "Characterization of polydimethylsiloxane block copolymers containing hydrophilic polymethacrylate segments", Nippon Kagakukaishi, No.8, pp.551-557 (1998).
- 5) K. Sugiyama, K. Isobe and K. Shiraishi, "Introduction of tetramethyldisiloxane moiety into polyether-urethaneurea", Nippon Kagakukaishi, No.11, pp.816-820 (1997).
- 6) K. Sugiyama, K. Shiraishi, K. Okada and O. Matsuo, "Biocompatible block copolymers composed of polydimethylsiloxane and poly ((2-methacryloyloxy) ethyl phosphorylcholine) segments", Polymer Journal, Vol.31, No.10, pp.883-886 (1999).
- 7) K. Mukae, Y. H. Bae, T. Okano and S. W. Kim, "A new thermo-sensitive hydrogel : Poly(ethylene oxide-dimethyl siloxane-ethylene oxide)/poly (N-isopropyl acrylamide) interpenetrating polymer networks I. synthesis and characterization", Polymer Journal, Vol.22, No.3, pp.206-217 (1990).
- 8) T. Okano, Y. H. Bae, H. Jacobs and S. W. Kim, "Thermally on-off switching polymers for drug permertion and release", Jouanal of Controlled Release, Vol.11, No.1/3, pp.255-265 (1990).
- 9) R. Yoshida, K. Uchida, Y. Kaneko, K. Sakai, A. Kikuchi, Y. Sakurai and T. Okano, "Comb-type grafted hydrogels with rapid de-swelling response to temperature change", Nature (London), Vol.374, No.6519, pp.240-242 (1995).
- 10) J. Kopeček, L. Sprincl and D. Lin, "New types of synthetic infusion solutions. I. Investigation of the effect of solutions of some hydrophilic polymers on blood", Journal of Biomedical Materials Research, Vol.7, No. 2, pp.179-191 (1973).
- 11) L. Sprincl, J. Exner, O. Sterba and J. Kopeček, "New types of synthetic infusion solutions III. Elimination and retention of

- poly [*N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] in a test organism", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol.10, No.6, pp.953-963 (1976).
- 12) V. Chytrý, J. Kopeček, P. Sikk, R. Sinijarv and A. Aavikaar, "A convenient model system for the study of the influence of water-soluble polymer carrier on the interaction between proteins", *Makromolekulare Chemie Rapid Communications*, Vol.3, No.1, pp.11-15 (1982).
 - 13) A. Laane, M. Haga, A. Aavikaar, V. Chytrý and J. Kopeček, "Activation of poly [*N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] for the binding of bioactive molecules, 1. Activation with 4-nitrophenyl chloroformate", *Makromolekulare Chemie*, Vol.184, No.7, pp.1339-1344 (1983).
 - 14) V. Chytrý and J. Kopeček, "Activation of poly [*N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] for the binding of bioactive molecules, 2. Activation with cyanogen bromide", *Makromolekulare Chemie*, Vol.184, No.7, pp.1345-1353 (1983).
 - 15) P. Kopečeková and J. Kopeček, "Release of 5-aminosalicylic acid from bioadhesive *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers by azoreductases in vitro", *Makromolekulare Chemie*, Vol.191, No.9, pp.2037-2045 (1990).
 - 16) R. Duncan, S. Dimitrijevic and E. G. Evagrou, "no title", *S. T. P. Pharmacol Sciences*, Vol.6, pp.237 (1996).
 - 17) K. Sugiyama, S. Mitsuno, Y. Yasufuku and K. Shiraishi, "Thermosensitive copolymers of *N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide and alkyl methacrylates", *Chemistry Letters*, No.3, pp.219-220 (1997).
 - 18) K. Sugiyama, S. Mitsuno and K. Shiraishi, "Adsorption of protein on the surface of thermosensitive poly(methyl methacrylate) microspheres modified with the *N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide and (2-methacryloyloxy) ethyl phosphorylcholine moieties", *Journal of Polymer Science. Part A: Polymer Chemistry*, Vol.35, No.16, pp.3349-3357 (1997).
 - 19) J. Strohm and J. Kopeček, "Poly *N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide]. IV. Heterogeneous polymerization", *Angewandte Makromolekulare Chemie*, Vol.70, pp.109-118 (1978).
 - 20) K. Sugiyama, T. Oku and K. Ooga, "Preparation and characterization of poly (methyl methacrylate) microspheres modified with both glucose and phosphorylcholine moieties", *Japanese Journal of Polymer Science and Technology*, Vol.53, No.2, pp.115-122 (1996).
 - 21) O. H. Lowry, N. I. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, "Protein measurement with the folin phenol reagent", *Journal of Biological Chemistry*, Vol.191, pp.265-275 (1951).
 - 22) K. Nakamae, T. Miyata, N. Ootsuki, M. Okumura and K. Kinomura, "Protein adsorption on a copolymer having pendant monosaccharide groups. Relationship between surface free energy and protein adsorption", *Macromolecular Chemistry and Physics*, Vol.195, No.11, pp.3597-3607 (1994).
 - 23) A. Takahara, K. Korehisa, K. Takahashi and T. Kajiyama, "Analysis of solid-water interfacial structure of polymeric solids based on Freeze-Etch X-ray photoelectron spectroscopy", *Japanese Journal of Polymer Science and Technology*, Vol.49, No.4, pp.275-280 (1992).
 - 24) K. Sugiyama and T. Oku, "Preparation and characterization of polystyrene microspheres surface-modified with glucose moieties", *Polymer Journal*, Vol.27, No.2, pp.179-188 (1995).
 - 25) K. Sugiyama and K. Sono, "Characterization of photo- and thermoresponsive amphiphilic copolymers having azobenzene moieties as side groups", *Journal of Applied Polymer Science*, Vol.81, pp.3056-3063 (2001).
 - 26) H. Sato, H. Morimoto, A. Nakajima and Y. Noishiki, "Study on interactions between plasma proteins and polymer surface", *Polymer Journal*, Vol.16, No.1, pp.1-8 (1984).
 - 27) H. Shirahama, K. Okuno, H. Tamai and T. Suzawa, "Preparation of micron-size polymer latices and singular and competitive adsorption of blood proteins onto those latices", *Japanese Journal of Polymer Science and Technology*, Vol.48, No.4, pp.211-220 (1995).