

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21750220

研究課題名（和文） 交互浸漬法を用いたポリイオンコンプレックス相形成による
インテリジェントゲルの創製研究課題名（英文） Preparation of Intelligent Gel by the Formation of Polyion
Complex with Alternative Immersion Approach

研究代表者

網代 広治（AJIRO HIROHARU）

大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・特任准教授（常勤）

研究者番号：50437331

研究成果の概要（和文）：

ポリ（ビニルアミン）とその前駆体ポリ（N-ビニルアミド）の溶解性の違いを利用して、交互浸漬法を適用することにより、表面をカチオン化したゲルを作成できた。ここへ第2の高分子を導入することで、表面のみが外部環境に応答する「表面ポリイオンコンプレックスゲル」（sPICゲル）を調製した。sPICゲルは、pH7で中性高分子を、pH2ではアニオン性低分子の放出を抑制し、薬物放出制御できる材料として利用できることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

Taking advantage of different solubility of poly(vinylamine) and poly(N-vinylamide)s, surface-cationized gel was prepared by applying layer-by-layer approach. The second polymer network was introduced into the gel to obtain the “surface polyion complex gel (sPIC gel)”, which only surface moiety is responsive to the circumstance change. sPIC gel suppressed neutral polymer at pH 7 and anionic low molecules, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学・高分子・繊維材料

キーワード：ゲル、薬物伝達システム

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に伴い、医療開発は急務である。医療の発展には高分子材料が大きく貢献しており、中でもゲルの特性・機能の基礎研究が急速に進歩した現在、ゲルは薬物伝達システム(DDS)の素材として盛んに研究展開されている。例えば、ヒドロゲル表面に無機物やポリマーを積層させ、薬物徐放を抑えようと

する試みがなされている。しかしながらこれらはゲル内部からの薬物拡散を抑えるものの、物理吸着又は析出した薄膜であるため剥離する問題が残されている。

一方1990年代になると日本から先駆的に、外界情報を感知し(センサー)、判断して(プロセッサー)、行動を起こす能力(アクチュエータ)を材料自身が併せ有する「インテリジェントゲル」と呼ばれる高度な機能性材料に

関する研究が活発に行われ始めた。例えば、人工尺取虫、人工モーター、接着脱着制御可能な細胞培養皿、などが特に有名であり、DDS分野においてもインスリンのオン-オフ制御など、膨潤収縮を利用した研究例が数多く知られている。

これまで研究代表者は、ポリ(N-ビニルアセトアミド) (PNVA)のノニオン性かつ両親媒性という特徴に着目し、DDSの観点から“薬物オールマイティステーション”となり得る経皮吸収製剤用基剤の開発に従事してその高強度化や生体親和性に関する報告を行ってきた。ここで研究対象としたPNVAやポリ(N-ビニルホルムアミド) (PNVF)は非共役モノマーから合成されるために、研究例が少なく応用展開が望まれている。さらにPNVAやPNVFはアミノ基を保護した構造的特徴を有し、ポリビニルアミン(PVAm)前駆体として機能する。実際に、ポリアクリル酸(PAAc)と相互侵入網目(IPN)ゲルを調製後に加水分解を行なうと、pHによって可逆的に“ゲル状-フィルム状”に変化するポリオンコンプレックス(PIC)膜が調製された。この予備的知見を基にして、ノニオン性ゲル表面のみへカチオン性を付与することができれば、膜の剥離を伴わない丈夫で新規なインテリジェントゲル創製と徐放制御が可能ではないか、との着想に至った。

2. 研究の目的

当該研究室では、互いに異なる溶液へ材料を交互に漬け込む簡便な「交互浸漬法」により、多孔性薄膜、有機無機ハイブリッド、細胞積層化技術など多くの研究成果を報告している。本研究ではこの手法を応用して以下の新手法を考案した。

まずノニオン性ヒドロゲルの表面部分のみを反応(加水分解)させるために、反応溶液(アルカリ水溶液)へごく短い時間浸し、溶液がゲル内部へ拡散するより早く引き上げる。次に、表面に付着した反応溶液を洗浄液(超純水)へ浸してよく洗浄し、初めの状態へ戻す。この操作を繰り返すことで、ゲル表面部分のみを化学的に修飾(加水分解)し、ポリカチオン相を生成させる。表面処理後、アクリル酸(AAc)等のアニオン性高分子を用いてIPNゲルを作成する。この際、安定な膨潤度を保つように、アニオン性高分子含有量を極力減らし、ゲル表面のみが効果的にゲル-フィルム転移を起こすPIC相形成を目指す。以上のように本応募申請課題の目的を、「安定な膨潤度を有するノニオン性ゲルにおいて、その表面へ化学的に結合した“ゲル-フィルム”転移可能なPIC膜を導入することにより、薬物徐放用の新規インテリジェントゲルを調製すること」と設定した。

3. 研究の方法

(1) 表面のみをPIC膜で被覆された(PNVA-co-PVAm/PAAc)ヒドロゲル創製

ポリオンコンプレックス(PIC)膜や(ノニオン性/アニオン性)相互侵入網目(IPN)ゲルを構成する高分子の組み合わせは様々であるが、NVAとNVFは化学構造上ともに窒素含有量が多いため、効率的にカチオンを表面へ導入可能と考えられる。そこで初年度はまずNVAとNVFを選択し、同理由によりポリアニオンにはアクリル酸を用いて実験を行なう。

これまでの文献に従い

5-Oxanonamethylene-bis-(*N*-vinylacetamide)を架橋剤、2,2'-Azobis-(2-methylpropionamidine) dihydrochlorideを開始剤として、まず高濃度(4M)のNVAヒドロゲル及びNVAとNVFのラジカル共重合体を合成する。NVFはNVAよりも加水分解が容易であるため、仕込みの混合比によって加水分解後のアミン量を制御できる。PNVFはNaOH_{aq.}(2N)およびHCl_{aq.}(2N)中80°Cにおいて約3時間で定量的に加水分解されるのに対して、PNVAはほとんど加水分解されないことが報告されている。そこで、浸漬時間を5分と設定し3時間分、つまり36サイクルの交互浸漬を行なう。この結果を基準として、加水分解の程度に応じて浸漬時間・サイクル数・温度・濃度を変化させ、表面のみを加水分解可能な新しい交互浸漬法を構築する。その程度や状態は、元素分析やアルラレッドによるアミノ基の染色、赤外分光測定装置および接触角測定装置で確認する。次にIPNゲル調製の条件を最適化し、ゲル表面において最も効果的に“ゲル-フィルム”転移を示すインテリジェントゲルの合成条件を明確とする。

(2) 本手法により調製されたインテリジェントゲルを用いた薬物徐放の制御
表面がゲルとなるアルカリ条件下または高イオン強度条件下において、薬物をゲル内部へ導入する。Poly(acrylamide-co-acrylic acid)ゲルからの徐放が既に報告されているKetoprofenやCaffeineを低分子薬物モデルとして、蛍光ラベル化Dextran(分子量4000-250000)を高分子薬物モデルとして、温度・pH・塩濃度を変化させた場合の徐放量をUV蛍光スペクトルまたは蛍光スペクトルによって追跡し、各インテリジェントゲルについて徐放制御能の位置づけを行なう。もし十分な徐放制御が得られない場合は、ゲル表面へポリアクリル酸を縮合剤によって結合させ、表面の架橋密度が向上したゲルを用いて徐放制御を行なう。

(3) 静電相互作用によって保持される複数薬物の選択的徐放の可能性検討

安定な膨潤度を示すノニオン性ゲル内部にあらかじめ多量のアニオン性及びカチオン性薬物を内包させ、外部を酸性あるいは塩基性条件下とした場合、最外層の“ゲルフィルム”転移に伴って、ゲルと同電荷を帯びた薬物が選択的に放出されると期待される。本研究全てのインテリジェントゲルについて、メチレンブルー(カチオン)アルラレッド(アニオン)をモデルとしUVにより放出挙動を解析する。次に、ゲルとの電荷バランスを考慮し、等電点に多様性のあるタンパク質を選択し、放出挙動はNMR、HPLCで解析する。

4. 研究成果

(1) 交互浸漬法によるポリイオンコンプレックスの調製

まず第一に達成した成果は、表面のみをポリイオンコンプレックス膜で被覆された(ポリビニルアミド-co-ポリビニルアミン/ポリアクリル酸)ヒドロゲルを調製する手法を確立したこと、および本手法により調製されたインテリジェントゲルを用いて薬物徐放の制御をおこなうことであった。これらは計画通り達成されたのでその概要を以下に記す。

①はじめに仕込むモノマー組成(N-ビニルアセトアミド/N-ビニルホルムアミド)を2/8とすることにより、強度を保ちながら加水分解において導入するカチオン量を最適化した。

②ポリアクリル酸の濃度(0.5~0.10M)を調節することにより、pH7付近で収縮するポリイオンコンプレックスを調製することに成功した。

③イソプロパノールによる相溶性の違い(ポリ(N-ビニルアミド)とポリビニルアミン)を利用して表面のみにポリイオンコンプレックス相を導入した。

④フルオレセインイソチオシアネートラベル化したデキストラン(分子量9500)をモデル薬物として徐放能を調べた結果、pH条件に反応して放出をコントロールすることが可能であった。

(2) 表面ポリイオンコンプレックスゲル(sPICゲル)の調製

1年目の研究からある程度分かってきた薬物徐放に関する知見についてさらに詳細に調べることにより、望みの条件で放出を抑制するといった徐放制御について検討を行った。これらも計画通り達成されたので、その概要を以下に記す。

①N-ビニルアセトアミド/N-ビニルホルムアミドから構成されるゲルを加水分解する際に、加水分解時間によって表面ポリイオン

コンプレックスゲル(sPICゲル)表面に導入されるポリイオンコンプレックス相をコントロールすることができた。

②sPICゲルの薬物徐放モデルとしてフルオレセインイソチオシアネートラベル化したデキストラン(FITC, 分子量9500)を用いた場合、pHのみならず、イオンコンプレックス相の厚みやイオン強度が、放出挙動に影響を与えることが分かった。

③放出制御メカニズムに網目の大きさではなくて静電的相互作用を利用するメカニズムを検討するために、低分子薬物モデルとしてアルラレッド(AR)を用いたところ、徐放制御が達成されFITCが徐放条件と異なることが示された。

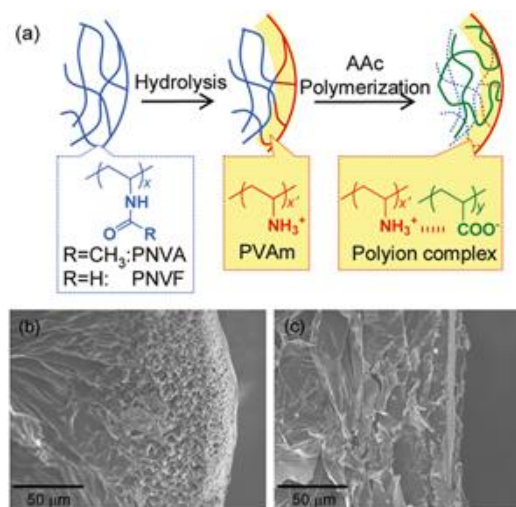


図1. (a) sPICゲルの調製 (b) sPICゲル断面のSEM図 (c) 通常のゲル断面のSEM図

(3) 薬物放出制御の達成

sPICゲルを用いて薬物として、低分子アニオンであるAllura Redを、高分子中性化合物としてFITCラベル化デキストラン(分子量約10000)を同時にsPICゲルへ担持して、その放出挙動を分析した。

まず、sPICゲルは内部のポリN-ビニルアミドが大部分を占めているため、ゲルの大きさはほとんど変化しないのに対して、pH7においてポリイオンコンプレックスを形成し、pH2ではポリビニルアミンが電荷反発により膨潤し、この変化は繰り返し観察された。

内包する薬物が中性で高分子量のものだとすると、小さい網目のときには放出が抑制され、大きな網目のときには放出されるといったサイクルが繰り返され、一方、内包する薬物が低分子であってもアニオン性を示すと、sPICゲルのこの変化にやはり反応して、ゲルが中和されている条件では放出され、ゲルが帯電している条件では放出が抑制されると

いうサイクルが繰り返された。

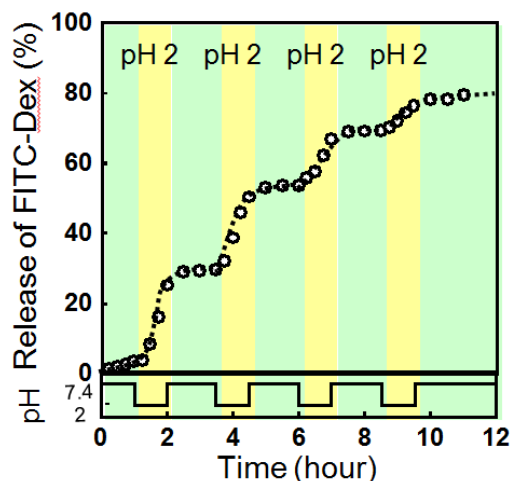


図 2. sPIC ゲルからの FITC ラベル化デキストランの放出制御の様子。

つまり、sPICゲルでは、安定な膨潤度を有しているながら放出制御能を有し、内包する薬物の種類に応じて放出条件が異なるという興味深い材料を構築できたと言える。

なお、本システムはポリアクリル酸の代わりにポリビニルホスホン酸を用いても可能であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Hiroharu Ajiro, Yoshikazu Takahashi, Mitsuru Akashi, “Thermosensitive Biodegradable Homopolymer of Trimethylene Carbonate Derivative at Body Temperature”, *Macromolecules* **2012**, *45*(6), 2668-2674.
2. Hiroharu Ajiro, Mitsuru Akashi, “Radical Polymerization of Novel *N*-Substituted-*N*-vinylformamide Derivatives with Bulky Chiral Substituents”, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2012**, *50*(1), 134-141.
3. Hiroharu Ajiro, Yukie Takemoto, Mitsuru Akashi, “Interpenetrating Polymer Networks of Poly(*N*-vinylacetamide) and Stimuli Responsive Polymers Applied to Novel Amphiphilic Gel”, *J. Nanosci. Nanotech.* **2011**, *11*(8), 7047-7049.
4. Yukie Takemoto, Hiroharu Ajiro, Taka-aki Asoh, Mitsuru Akashi, “Fabrication of Surface-Modified

Hydrogels with Polyion Complex for Controlled Release”, *Chem. Mater.* **2010**, *22*(9), 2923-2929.

5. Hiroharu Ajiro, Mitsuru Akashi, “Nano Grape Formation by *isotactic*-Poly(methacrylic acid)-*block*-poly(butyl acrylate)”, *Macromol. Rapid Commun.*, **2010**, *31*(8), 714-717. [Cover Picture].
6. Hiroharu Ajiro, Mitsuru Akashi, “Cell Proliferation on Stereoregular *isotactic*- Poly(propylene oxide) as a Bulk Substrate”, *Biomacromolecules* **2010**, *11*(11), 2840-2844.
7. Hiroharu Ajiro, Yukie Takemoto, Taka-aki Asoh, Mitsuru Akashi, “Novel Polyion Complex with Interpenetrating Polymer Network of Poly(acrylic acid) and Partially Protected Poly(vinylamine) Using *N*-Vinylacetamide and *N*-Vinylformamide”, *Polymer* **2009**, *50*(15), 3503-3507.

[学会発表] (計 10 件)

1. ○網代広治「高分子構造制御による新規素材探索」第 11 回次世代医工学研究会、ショートプレゼン No. 11、大阪 (大阪大学吹田キャンパス)、2011 年 10 月 21 日。
2. ○網代広治・竹村一哉・明石 満「ポリ (*N*-ビニルアミド) ゲルの表面カチオン化とポリイオンコンプレックスを利用した薬物徐放制御」第 60 回高分子学会討論会、1L11、岡山 (岡山大学津島キャンパス)、2011 年 9 月 28 日-30 日。 *Polym. Prep. Jpn.*, **60**, 3565-3566 (2011).
3. ○網代広治・明石 満「表面ポリイオンコンプレックスゲルによる二種類の薬物徐放制御 (Dual drug release system by surface polyion complex hydrogel)」(英語口頭発表) 第 60 回高分子学会年次大会、3L16、大阪 (大阪国際会議場)、2011 年 5 月 25 日-27 日。 *Polym. Prep. Jpn.*, **60**, 1384 (2011).
4. ○網代広治 [*招待講演]「相互侵入網目構造を導入したポリ (*N*-ビニルアミド) ゲルの新規材料創製」高分子学会精密ネットワークポリマー研究会、兵庫 (兵庫県立大学姫路書写キャンパス 書写記念会館) 2011 年 3 月 8 日。
5. ○網代広治・明石 満「立体規則性合成高分子を用いた表面修飾における構造と生体適合性評価」第 32 回日本バイオマテリアル学会大会、広島 (グランドプリンスホテル広島)、2010 年 11 月 29 日 (月) -30 日 (火)

6. ○ **Hiroharu Ajiro**, Yukie Takemoto, Mitsuru Akashi, “Simple Polyion Complex Hydrogel by Poly(acrylic acid) and Partially Protected Poly(vinylamine)” 11th Pacific Polymer Conference 2009, PPC 11, Cairns Convention Centre, Cairns (Australia), Session T5.2 Biomaterials and Hydrogels 0483, December 6th - December 10th 2009.
7. ○ 竹本友紀恵・**網代広治**・麻生隆彬・明石 満「表面に刺激応答性ポリイオンコンプレックス膜を有するゲルの調製と薬物放出制御」第 58 回高分子学会討論会、2L3-03、熊本（熊本大学工学部）2009 年 9 月 16 日－18 日. *Polym. Prep. Jpn.*, **58**, 4281-4282 (2009).
8. 竹本友紀恵・**網代広治**・明石 満、「薬物放出制御のためのポリ(N-ビニルアミド)ゲルの表面改質」、日本バイオマテリアル学会第 4 回関西若手研究発表会、2009 年 8 月 7 日、大阪（大阪大学銀杏会館）
9. **Hiroharu Ajiro**, Yukie Takemoto, Mitsuru Akashi, “Amphiphilic poly(N-vinylacetamide) hydrogel modified with interpenetrating network approach for transdermal therapeutic systems”, The 36th International Congress of Physiological Sciences, 2009 年 7 月 29 日、京都（国際会館）
10. 竹本友紀恵・**網代広治**・麻生隆彬・明石 満、「ポリイオンコンプレックスにより表面被覆されたゲルの調製と薬物放出制御」、第 55 回高分子研究会、2009 年 7 月 17 日、神戸（兵庫県民会館）

[その他]

ホームページ等

(1) 研究室のホームページ

http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~akashi-lab/member/ajiro/ajiro_profile.html

(2) 大学の個人研究者のページ

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=7677&f1=06&sm=field&sl=ja&sp=1>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

網代 広治 (AJIRO HIROHARU)

大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・特任准教授（常勤）

研究者番号：50437331

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者