

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750220

研究課題名(和文) 表面カチオン化ポリ(N-ビニルアミド)ゲルを利用した新規薬物徐放制御材料の創製

研究課題名(英文) Creation of novel controlled drug release material using surface cationic poly(N-vinylamide) gel

研究代表者

網代 広治(Ajira, 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：表面のみを選択的にカチオン化することが可能なポリ(N-ビニルアミド)等を用いて、新規薬物徐放制御材料の創製を行った。まずゲル網目の中に第二成分の高分子鎖を導入する相互侵入網目構造を適用して、「表面ポリイオンコンプレックスゲル」(sPIC)ゲルを調製した。ポリビニルホスホン酸を用いた場合の徐放挙動を明らかにし、またポリエチレングリコール鎖を導入すると高強度を付与可能なことが分かった。カチオン化ポリマーとしてキトサンを用いたゲルが電荷による薬物取込が可能であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Novel materials for controlled drug release system have been investigated using poly(N-vinylamide), which can be cationized only on surface. sPIC gel (surface polyion complex gel) was introduced with interpenetrating polymer network, using vinyl phosphonic acid, and its drug releasing control was examined. Poly(ethylene glycol) was introduced into poly(N-vinylacetamide) gel to obtain the high mechanical strength. Chitosan as cationic polymer was employed for hydrogel to absorb electrostatically charged drugs.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料科学・高分子・繊維材料

キーワード：薬物徐放 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。医療の発展に高分子材料は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放出の抑制が試みられているが、いずれも剥離が問題となる。一方、1990年代には日本から先駆的に、外部情報を感知、判断、行動する能力を材料自身が合わせ有する「インテリジェントゲル」という高度な機能性材料が活発に研究され始めた。例えば人工尺取虫、人工モーター、脱着可能な細胞培養皿等が有名であり、DDS 分野においてもインスリン放出のオン-オフ制御、など膨潤収縮を利用した研究例が数多く報告されている。

これまでに研究代表者は、*N*-ビニルアミドを出発物質として様々な相互侵入網目(IPN)を報告してきた。ポリ(*N*-ビニルアセトアミド)(PNVA)やポリ(*N*-ビニルホルムアミド)(PNVF)は加水分解すると高分子主鎖側にアミノ基が残存するため、ポリカチオンのポリビニルアミン(PVAm)を与える(図1)。

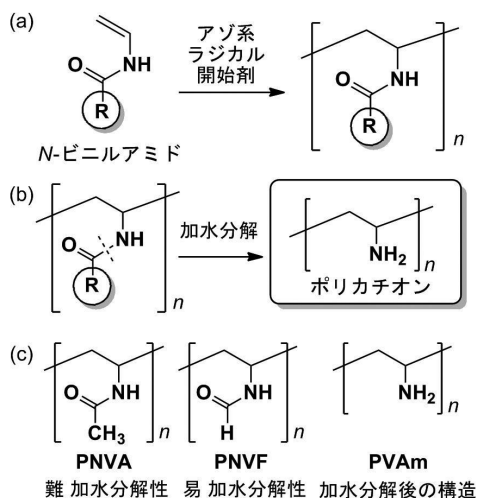


図1 (a)*N*-ビニルアミドの重合。(b)加水分解によるポリカチオン生成。(c)*N*-ビニルポリマー構造式。

PNVA-co-PNVF と PVAm とのイソプロパノールに対する溶解性の違いを利用すると表面部分のみを選択的に加水分解可能であり、ノニオン性内部とカチオン性表面が化学結合で結ばれたゲルを調製できる。本手法は我々によって既に確立され、膜厚を制御することが可能である。さらにポリアクリル酸とのIPNを調製すると、表面だけがポリイオンコンプレックス層を有する表面ポリイオンコンプレックスゲル(sPICゲル)を作製することができる。

sPICゲルは、内部のノニオン性ポリ(*N*-ビニルアミド)ゲルが大部分の体積を占め安定な膨潤度を有するのに対して、極薄い表面部

はポリイオンコンプレックスから構成されるため、pH環境に応答して膨潤度が変化する。つまり、それぞれを「薬物貯蔵部」と「徐放制御部」とみなすことができ、インテリジェントゲルとして活用可能と期待される。

しかし sPICゲルの報告例は現在のところ一報のみであり、その例では構成するポリアニオンとしてポリアクリル酸を、薬物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デキストラン(FITC-dex, 分子量9500)をそれぞれ用いているが、実用的な薬物徐放制御の構築を目指すためには、薬物の静電相互作用や分子量、応答するpH領域など、さらなる検討が必要である。

2. 研究の目的

これまでに *N*-ビニルアセトアミドおよび *N*-ビニルホルムアミドの化学構造の特徴を活かして、ノニオン性ヒドロゲル表面のみを選択的にカチオン化する手法を構築している。そこで、本応募課題の目的を「ポリ(*N*-ビニルアミド)およびポリカチオン等を用いて、種々のアニオン性ポリマーおよび刺激応答性官能基をカチオン化したゲルに導入することにより、薬物徐放を実用的な観点から対応できる新規インテリジェントゲルを構築すること」と設定した。

3. 研究の方法

PNVA/PNVF ノニオン性ゲルの表面部分のみを PVAm カチオンへ変換する手法を用い、sPICゲルを多様化する。既報ではアニオン層にアクリル酸(AAc)を用いたのに対し、本応募研究課題では他のアニオン性化合物とIPN化することで、様々なpH領域において表面部分のみが応答するsPICゲルを調製する。近年、生体材料への適用例や重合反応性が報告されているビニルホスホン酸(VPh)を用いる。計画通り反応が進行しない場合には、天然由来高分子の利用も検討し、生体適合性の高い材料構築を合わせて目指す。

表面カチオン化ゲルを利用し、新規インテリジェントゲルを調製する。感熱応答性を提供するオリゴエチレングリコール(OEG)及び *N*-ビニルイソブチルアミド(NVIBA)等の刺激応答性置換基にカルボン酸を導入し、ゲル表面の PVAm と縮合反応により、結合させる。導入された刺激応答性が生理条件下で発現困難な場合には、抗原-抗体反応も検討する。

また、調製されたゲルについてはまず FITC-dex をモデル薬物として薬物徐放実験を行なう。実用薬剤には種々のタンパク質が挙げられるが、これまでにモデル薬物として徐放制御を行なった FITC-dex(静電的に中性な高分子化合物)や予備的知見として得ているアルラレッド(アニオン性低分子化合物)、メチレンブルー(カチオン性低分子化合物)とは異なって両性高分子化合物である。

最後に、従来の sPIC ゲル系では、刺激応答部が約 80 μ m 厚であるため、全体として安定な膨潤度を示すためには、ヒドロゲルが cm オーダーの大きさが必要であった。ここでは、本システムをナノサイズで発現させるために、表面構造を変化可能な新しいナノシステムを構築する。

4. 研究成果

まず初めに予定していた VPh を利用した sPIC ゲルについて調製し、薬物徐放を調べた。表面ポリカチオン化ゲルは文献に従って調製した。VPh を NaOH 水溶液で中和し、VPh が 0.50 M になるように、架橋剤の *N, N'*-メチレンビスアクリルアミド (MBAAm, 5 mol% to VPA)、開始剤の過硫酸アンモニウム (APS, 0.5 mol% to VPh) と共に 0.01 M HCl 水溶液に溶かした。このモノマー溶液を 0.01 M HCl 水溶液で希釈することで、[VPh] = 0.25 M、0.10 M であるモノマー溶液を調製し、ゲルを浸漬して一晩静置した後、重合促進剤としてテトラエチルメチレンジアミン (TEMED) を加え、60 °C、8 時間で重合を行った後、0.1 M NaCl 水溶液で十分洗浄し sPIC gel を得た。

調製した sPIC gel を、アルーラレッド (AR) を溶解させた 2 M NaCl 水溶液 (25 mg/mL) に 12 時間、同濃度の AR を溶解させた超純水に 12 時間、順に浸漬させた後、pH 2、pH 5、pH 7 の水溶液 (イオン強度は 0.24 M に統一) に浸漬させた。所定時間後に上澄み液を分取し PBS で 20 倍に希釈した後、放出量を吸光度から算出した。

結果を図 2 に示す。どの VPA の濃度においても、pH 5 や pH 7 に比べ、pH 2 で放出が抑制される傾向が見られた。AAc の sPIC gel に比べ pH 2 で放出されているのは、VPA の一段階目の酸解離定数が小さいため、AR と VPh の間で静電反発が生じているからだと考えられる。また、どの VPh の濃度においても、pH 5 と pH 7 で放出挙動に大きな差は見られなかった。pH 5 でポリビニルホスホン酸 (poly(VPh)) のリン酸基は 1 価のアニオンになっていると考えられ、AAc の sPIC gel と比べゲル表面のカチオン性が弱いと考えられる。そのため、pH 5 でゲル表面と、アニオンである AR との静電相互作用が弱くなり、AR が pH 5 で放出されたと考えられる。

一方、タンパク質としてリゾチーム、ラクトアルブミン、インシュリンを用いて sPIC ゲルからの徐放実験を行ったが、FITC-dex や AR に観測したような pH による放出制御は今のところ達成できていない。そこで次に、*N*-ビニルアミド系のポリカチオンに限定しては放出制御に多様性を持たせることが難しいと考えて、次に天然高分子の利用を行った。

天然高分子のポリカチオンとしてキトサンを選んだ。スルホン基含有架橋剤と反応させることでヒドロゲルを得た。sPIC ゲルの薬

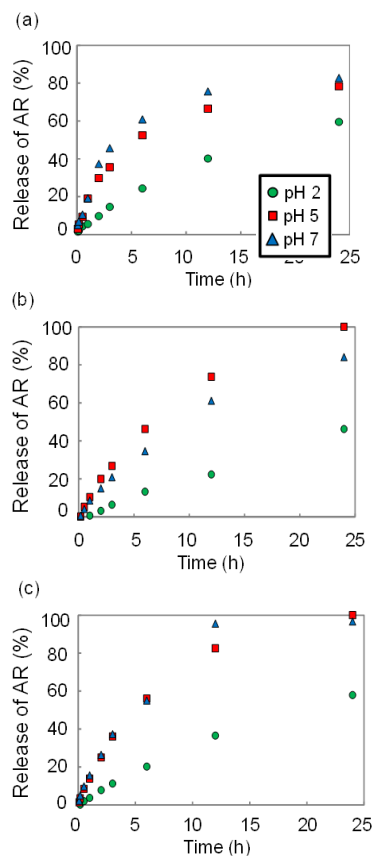


図 2 .VPh を使用した sPIC ゲルからの AR 放出挙動。(a) [VPh] = 0.50 M、(b) [VPh] = 0.25 M、(c) [VPh] = 0.13 M。

剤放出制御に働く静電相互作用を利用して、薬物吸着実験を行った。その結果、架橋剤のアニオン性置換基の種類によって、電荷の帯びた薬物吸着挙動に違いが認められた (発表雑誌論文 2)。

一方、表面ポリカチオン化ゲルを利用して、表面に無機材料であるシリカゲルをコーティングし、有機-無機ハイブリッド材料の構築を試みた。3-(トリエトキシシリル)プロピルイソシアネートをガラス管の中に導入し 0 に保ち、次に表面カチオン化ゲルを導入した。続いて、シリカナノ粒子 (直径 100 nm) を添加して調製した。SEM 観察の結果を図 3 に示す。

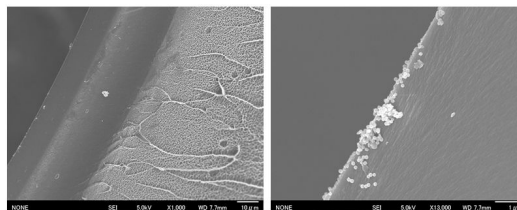


図 3 .シリカゲルナノ粒子を表面に結合させた表面ポリカチオン化ゲル

上述のゲルは表面をシリカゲルナノ粒子で被覆したものであるため、放出制御の実験に用いた。薬物に 5-フルオロウラシルを選択して、当該ゲルからの放出を比較すると、Si 粒子でほぼ覆われたゲルについて、PBS 溶液

中からの放出挙動と、HCl 水溶液中からの放出挙動に違いがみられた。pH によってシリカゲルナノ粒子の被服状態が異なることによると考えられる。

続いて PNVA ゲルと種々の高分子との相互作用を調べる一環としてポリエチレングリコール(PEG)と semi-IPN 構造を導入した。PEG の分子量が 200、400、600 程度のもを用いると、これらは液体であるため、PNVA ゲルのヒドロゲルを、これらの溶媒中へ導入することで単純拡散による溶媒置換ができる。この操作によって semi-IPN 化を行った。写真を図 4 に示す。PEG200 ではヒドロゲルとほぼ同じ形状であったのに対して、PEG400 および PEG600 を用いると、大きく収縮し、高強度となった。これを応力ひずみ曲線を比較すると、10 MPa 程度の強度を示した(図 5)。

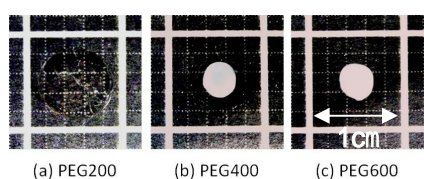


図 4 . PEG で膨潤させた PNVA ゲルの写真。(a)PEG200、(b)PEG400、(c)PEG600。

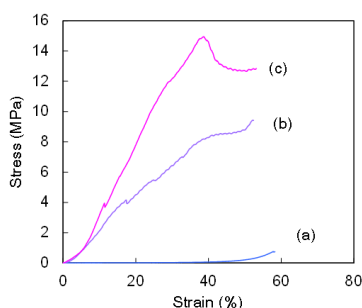


図 5 . PEG で膨潤した PNVA ゲルの応力-ひずみ曲線(a)PEG200、(b)PEG400、(c)PEG600。

上述のゲルは赤外分光スペクトルによる比較から、PEG 末端のヒドロキシル基、および PNVA のアミド基由来のピークがそれぞれ単独のもの比べてシフトしていることから、高分子間相互作用が働いて強度を増しているものと考えられる。NVA および PEG はいずれも生体適合性の高い素材であるため、実用的な徐放材料のみならずバイオマテリアルとしての利用が期待される(発表雑誌論文 1)。

また、ナノサイズの徐放に関連して、sPIC ゲルと同組成のナノゲルを調製することが困難だった。そこで、親疎水バランスを付与したポリマーのナノ粒子を用いて徐放実験に用いた。親水性置換基としてメトキシエトキシ基を導入した生体適合性ポリマーのナノ粒子を用いると、抗がん剤であるシクロフォスファミドの徐放が達成された(発表雑誌論文 3)。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Yukie Takemoto, Hiroharu Ajiro, Mitsuru Akashi, “Amphiphilic Poly(N-vinylacetamide) Gels Strengthened with Swelling Solvent”, *Macromol. Chem. Phys.* **2014**, 215(4), 384-390. (DOI:10.1002/macp.201300526). 査読有.
2. Giuseppe Tronci, Hiroharu Ajiro, Stephen J. Russell, David J. Wood, Mitsuru Akashi “Tunable drug-loading capability of chitosan hydrogels with varied network architectures” *Acta Biomaterialia*, **2014**, 10(2), 821-830. (DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.014). 査読有.
3. Hong Chu, Hiroharu Ajiro, Yoshikazu Takahashi, Mingqing Chen, Mitsuru Akashi “Nanoparticle Fabrication with Biodegradable Block Copolymer Composed of Hydrophilic Poly(trimethylene carbonate) Derivative and Hydrophobic Polylactide” *Chem. Lett.* **2013**, 42(1), 74-76. (DOI:http://dx.doi.org/10.1246/cl.2013.74). 査読有.

[学会発表](計 20 件)

1. 網代広治・竹本友紀恵・明石 満「化学架橋剤を用いないポリ(N-ビニルホルムアミド)ゲルの調製」第 63 回高分子年次大会、名古屋(名古屋国際会議場)、2014 年 5 月 28 日 30 日。
2. 竹村一哉・網代広治・藤原知子・明石 満「アミド形成によるポリ乳酸共重合体のオイルゲル創製」第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、東京(タワーホール船堀)、2013 年 11 月 25 日 26 日。
3. Giuseppe Tronci, Hiroharu Ajiro, Stephen J. Russell, David J. Wood, Mitsuru Akashi, “Bioactive Chitosan Hydrogels with Varied Network Architecture and Tunable Drug-loading Capability”, TERMIS-AP 2013 Annual Conference, Shanghai & Wuzhen, (China). October 23rd-26th 2013.
4. Hiroharu Ajiro [*Invited] “Fabrication of Novel Stimuli-responsive Polymers by Molecular Design Approach” Department of Chemistry, The Chinese University of Hong Kong (Hong Kong). October 23rd 2013.
5. Hiroharu Ajiro, Kazuya Takemura, Yukie Takemoto, Mitsuru Akashi [*Invited] “Controlled Release by

Surface Polyion Complex Gel with Poly(N-vinylamide)s ” NMS-IX & FCFP-XXIII, Shanghai (China), October 17th -22nd 2013.

6. **網代広治**「高分子構造制御による新規素材探索」第13回次世代医工学研究会、大阪(みのお山荘) 2013年6月21日22日.
7. **網代広治**・高橋良和・明石 満「感熱応答性高分子を与えるトリメチレンカーボネート誘導体を用いた共重合体の合成」日本化学会第93春季年会、滋賀(立命館大学びわこ・くさつキャンパス) 2013年3月22日 25日.
8. 高橋良和・**網代広治**・藤原知子・明石 満「親水性ポリカーボネート誘導体とポリ乳酸から成るブロック共重合体の高分子薄膜の表面特性」第58回高分子研究発表会、兵庫(兵庫県民会館) 2012年7月13日.
9. 高橋良和・**網代広治**・藤原知子・明石 満「親水性ポリカーボネート誘導体とポリ乳酸から成るブロック共重合体の合成」第61回高分子学会年次大会、横浜(パシフィコ横浜) 2012年5月29日.
10. 高橋良和・**網代広治**・藤原知子・明石 満「ポリカーボネート誘導体とポリ乳酸の共重合体薄膜を用いた外部環境による表面特性制御」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、仙台(仙台国際センター) 2012年11月26日 27日.
11. **Hiroharu Ajiro**, Yoshikazu Takahashi, Mitsuru Akashi [*Invited] “Molecular Design for Functional Biodegradable Polymers Based on Poly(trimethylene carbonate)” NMS-VIII & FCFP-XXII, Xi ' An (China). October 14th -19th 2012.
12. 高橋良和・**網代広治**・藤原知子・明石 満「親水性ポリカーボネート誘導体とポリ乳酸からなるブロック共重合体の合成とその機能評価」第61回高分子討論会、名古屋(名古屋工業大学) 2012年9月19日 21日.
13. 竹村一哉・**網代広治**・明石 満「表面にアニオン性ポリマーと相互侵入網目を構築した種々のポリ(N-ビニルアミド)ゲルと薬物放出」第61回高分子討論会、名古屋(名古屋工業大学) 2012年9月19日 21日.
14. **Hiroharu Ajiro**, Hong Chu, Yoshikazu Takahashi, Mitsuru Akashi, “Nanoparticles using Block Copolymer of Lactide and Trimethylene Carbonate Derivative Bearing Methoxyethoxy Side Groups for Controlled Drug Release Application”, The 4th International NanoBio Conference, Bell Harbor International Convention Center, Seattle, WA (USA). July 23rd - 26th 2012.
15. 竹村一哉・**網代広治**・明石 満「N-ビ

ニルアミドとビニルホスホン酸を用いたヒドロゲルの表面構造制御」第41回医用高分子シンポジウム(東京(東京大学先端科学技術研究センター) 2012年6月25日.

16. **Hiroharu Ajiro**, Kazuya Takemura, Mitsuru Akashi “Design and Fabrication of Surface Polyion Complex Gel” IUPAC World Polymer Congress, Virginia Tech Campus, Blacksburg, VA (USA). June 24th - 29th 2012.
17. 竹村一哉・**網代広治**・明石 満「ポリ(N-ビニルアミド)ゲルを用いた複数薬物の放出制御材料の創製」第61回高分子学会年次大会、横浜(パシフィコ横浜) 2012年5月30日.

〔図書〕(計1件)

1. 竹本友紀恵, **網代広治**, 明石 満, “第1章 徐放のための材料. 1. 高分子 合成高分子(非吸収性)” ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線 - 古くて新しいドラッグデリバリーシステム(DDS), 遺伝子医学MOOK, pp. 40-44. 発行2013年. 編集田畑泰彦. 出版 株式会社メディカルドゥ.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: “分子内相互作用に基づく高強度ゲル”
発明者: 明石満、**網代広治**、竹本友紀恵
権利者: 国立大学法人大阪大学
種類: 特許権
番号: 特願 2013-135035
出願年月日: 2013年6月27日
国内外の別: 国内特許

〔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/ajiro.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&a2=0000067&o=affiliation&sm=affiliation&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