

ポリアスパラギン酸系温度応答性ゲルの創製

上原広樹* 谷元史明* 北村吉朗* 吉澤秀和*

Synthesis of Novel Temperature-responsive Polymer Gel of Poly(aspartic acid)s

Hiroki UEHARA, Fumiaki TANIMOTO

Yoshiro KITAMURA, Hidekazu YOSHIZAWA

(Received November 30, 2005)

Recently, thermo-responsive polymer gels have been studied in various research fields such as drug delivery system. One of representative thermo-responsive polymer gels is poly(*N*-isopropylacrylamide) gel (PNIPAAm) that has a rapid and reversible volume phase transition. However, PNIPAAm is not biodegradable, resulting in limitation of its use in medical fields. Novel thermo-responsive polymer gel was prepared by crosslinking of isopropylamine modified poly(succinimide) (IPA-PSI) (Poly[α , β -(DL-aspartate isopropyl amide)-co-(succinimide)]) with hexamethylenediamine. Because of peptide bonds in backbone, therefore, it is expected to possess biodegradability and biocompatibility. These gels changed their volume in response to change of environment such as temperature, pH and concentration of salt in water. Crosslinkage density and substitution degree of IPA-PSI affected volume phase transition behavior of the gel.

Key words : Thermo-responsive polymer gel, Biodegradable polymer, Poly(aspartic acid), Lower Critical Solution Temperature (LCST), Drug delivery system (DDS)

1 緒言

近年、温度・pH・光などの外部刺激に対して体積や物性が可逆的に変化する刺激応答性ゲルに関する研究が活発に行われている。温度応答性ゲルはこれら刺激応答性ゲルの1つであり、下限臨界共溶温度(Lower Critical Solution Temperature 以後 LCST)以下では膨潤、LCST 以上では収縮という可逆的体積相転移を示す。この性質を利用してドラッグデリバリーシステムなどへの応用が活発に研究されている。しかしながらポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)ゲルなどの既存の温度応答性ゲルは完全生分解性をもたないために医薬分野での応用に制限がある。

そこで本研究では生分解性高分子であるポリアスパラギン酸誘導体に注目した。これまでに本研究室において、ポリアスパラギン酸誘導体の一つであるポリコハク酸イミド(以後 PSI)の側鎖にイソプロピルアミンを導入したイ

ソプロピルアミン導入 PSI(以後 IPA-PSI)を合成し、温度応答性を示すことを明らかにした(Fig. 1)。本研究ではこの温度応答性高分子 IPA-PSI の分子内に残されたイミド環にジアミンを反応させて架橋することによって、ポリアスパラギン酸系温度応答性ゲルの調製を目指した。このゲルは構造中にペプチド結合を持つことから高い生分解性及び生体適合性を有すると考えられ、医薬分野での応用が期待できる。

本報告では、生分解性を有する温度応答性ゲルの調製と体積相転移に及ぼすゲルの構造の影響、および pH・塩濃度に対する応答性の評価結果を報告する。

2 実験方法

2.1 IPA-PSI の合成と評価

* 岡山大学環境理工学部環境物質工学科

PSI はリン酸を触媒とした L-アスパラギン酸の重縮合により合成した。重合終了後生成物を DMF に溶解し、蒸留水で再沈殿、洗浄後にろ過により生成物を回収し、減圧乾燥した。得られた PSI は $^1\text{H-NMR}$ (溶媒 DMSO-d_6)により構造を確認し、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)により分子量を測定した。GPC は溶離液に DMF、基準物質にポリスチレンを用いた。

得られた PSI を蒸留 DMF に溶解し、窒素雰囲気下でイソプロピルアミンと任意の時間反応させた。反応終了後、アセトニトリルに反応溶液を投入し再沈殿、洗浄後、遠心分離により回収し、減圧乾燥させた。生成した IPA-PSI は $^1\text{H-NMR}$ (溶媒 DMSO-d_6)により構造を確認し、側鎖導入率 (Fig. 2 中 $m/(m+1) \times 100$)を算出した。また温度応答性の評価として電子冷熱式セル温度コントローラーを搭載した吸光光度計を用いて、温度を連続的に変化(昇温→降温)させて水溶液の濁度の変化を測定した。

2.2 IPA-PSI 系ゲルの調製

高導入率 IPA-PSI(側鎖導入率: 70~80%, 以後 *high-IPA-PSI*)と架橋点補助物質として PSI、または低導入率 IPA-PSI(側鎖導入率: 20%, 以後 *low-IPA-PSI*)を任意の割合で溶解した DMF 溶液に所定量のヘキサメチレンジアミン(以後 HMDA)を添加し室温で充分反応させた。調製したゲルは DMF を除去するため純水中で約 1 週間洗浄した。なお洗浄に用いた純水は所定時間ごとに交換した。

また、架橋密度はポリマー内の全イミド環のモル数に対する添加した HMDA のアミン基のモル数の割合と定義した。ゲルの基本調製条件を Table 1 に示す。

2.3 ゲルの温度応答性評価

約 5 mm の厚さに切断したゲルを純水中に浸して 4 °C から 70 °C まで段階的に加熱後、再び 4 °C まで段階的に冷却した。各温度で 1 時間保温した後、水を含んだゲルの質量を測定した。また、ゲルを加熱・冷却後に減圧乾燥し、乾燥質量を測定した。これらの測定値より各温度におけるゲルの膨潤度(Swelling ratio ;SR)を以下の(1)から算出した。

$$SR = \frac{W - W_0}{W_0} \quad (1)$$

ここで W はゲルの膨潤質量[g]、 W_0 はゲルの乾燥質量[g]を表している。

また、pH の異なる緩衝液あるいは NaCl 水溶液中でも同様の実験を行った。

更に pH や塩濃度に対する応答性を評価するため、ゲルを浸した水溶液の pH・塩濃度を段階的に変化させ、膨潤度の変化を観察した。

3 実験結果と考察

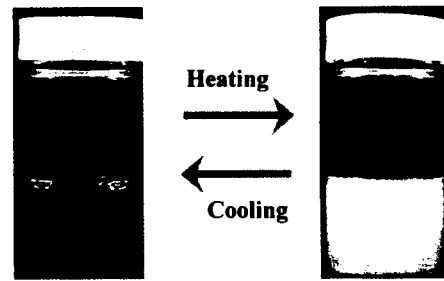


Fig. 1 Thermo-responsive polymer (IPA-PSI).

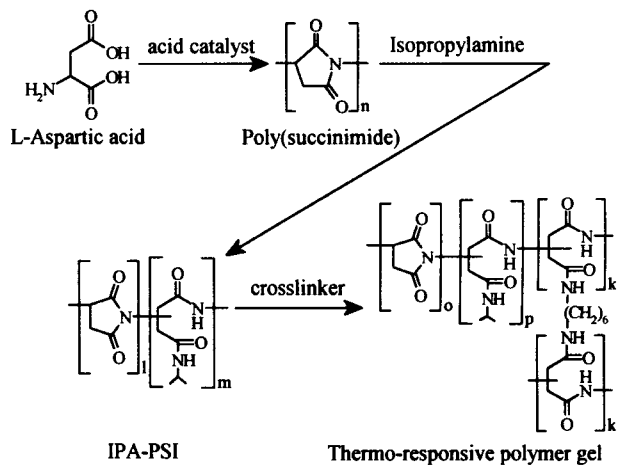


Fig. 2 Synthetic scheme of thermo-responsive polymer gel

Table 1 Preparation condition of IPA-PSI gel.

Entry	<i>high-IPA-PSI</i> [g]	PSI or <i>low-IPA-PSI</i> [g]	HMDA [g]	Crosslinkage density [%]
1	1.00	-	0.0815	98.1
2	0.90	0.50(PSI)	0.0601	15.1
3	0.90	0.50(<i>low-IPA-PSI</i>)	0.1065	37.1

3.1 IPA-PSI の合成と評価

$^1\text{H-NMR}$ により PSI の合成を確認し、GPC 測定結果より重量平均分子量 $M_w = \text{Ca.}30,000$ であることを確認した。

また、IPA-PSI の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて 1.1~1.2ppm、3.8ppm、4.5ppm にイソプロピルアミンの導入に起因するピークが現れたことから IPA-PSI の合成を確認した。4.5ppm のイミド環の開環に起因するピークの積分値①と 5.0ppm のイミド環に起因するピークの積分値②の比より側鎖導入率を(2)から算出した。m 及び l は Fig. 2 に示した IPA-PSI の分子構造中の各セグメント数である。

$$\text{Substitution degree [\%]} = \frac{m}{m+1} \times 100 = \frac{\textcircled{1}}{\textcircled{1} + \textcircled{2}} \times 100 \quad (2)$$

合成した *high*-IPA-PSI は水に易溶でその水溶液は温度変化に対して可逆的に相転移を示すことが確認された。この *high*-IPA-PSI を主にゲル調製に用いた。*low*-IPA-PSI は水にほとんど溶解せず温度応答性も示さない。この *low*-IPA-PSI は、架橋点を補う物質として使用した。

3.2 IPA-PSI 系ゲルの調製と評価

high-IPA-PSI のみを用いて調製したゲル(Entry 1)は洗浄後強度がかなり小さく、温度応答性評価は行えなかった。この原因をイミド環(架橋点)の不足と考えた。

不足しているイミド環を補うため *high*-IPA-PSI と共に PSI を DMF に溶解させ、ゲルの調製を行った(Entry 2)ところ、架橋点となるイミド環の増加によりゲルの強度は向上したが、調製したゲルは白濁し、ほとんど水と馴染まなかった。これは PSI の疎水性が高く、調製したゲルと水の親和性が低かったためと考えられる。

そこで架橋点を補う物質を PSI より若干親水性の高い *low*-IPA-PSI に換えゲルの調製を行った(Entry 3)。その結果 *high*-IPA-PSI:*low*-IPA-PSI=1.8:1(重量比)、架橋密度 37.1% において適度な強度と親水性を持つゲルを調製することに成功した(Fig. 3)。この調製条件を基準にして架橋密度が高いゲルと低いゲルを調製した。

それぞれのゲルの膨潤度の温度依存性を調べた結果を Fig. 4 に示す。なお、架橋密度が高いゲルほど高強度なゲルが得られた。図より架橋密度の上昇に伴って、同じ温度での膨潤度は低下することがわかる。また、架橋密度が高くなると加熱過程における収縮率は小さくなることわかる。これは架橋点の増加により高分子鎖の運動が抑制されるためと考えられる。また架橋密度が 27.8% のゲルでは 60℃ 以上の加熱により膨潤度が増加した。これは架橋密度が小さいためゲル中に残基イミド環の割合が多く、加熱によりこのイミド環が開環することで高分子鎖の親水性が増加し、大きく膨潤したと考えられる。架橋密度が 37.1% のゲルでは冷却過程で膨潤度の復元が不完全であったが 44.8% のゲルではほぼ完全に復元した。架橋密度 37.1% において、このようなヒステリシスがある原因として、加熱時にイミド環同士の相互作用による安定化効果により、収縮した状態でゲルの構造が安定化してしまったためと考えられる。そのため、残基イミド環の多いゲルではその安定化作用により相転移が不可逆となり、残基イミド環の少ないゲルでは相転移が可逆的に進行したと考えられる。これは IPA-PSI が側鎖導入率の低いときに相転移が不可逆になることと同じ理由といえる。

また 44.8% のゲルを繰り返し加熱・冷却し相転移の再現性を調べた結果を Fig. 5 に示す。これより、架橋密度が大きいゲルでは、体積相転移が再現よく繰り返し起こるこ

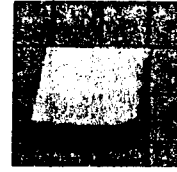


Fig. 3 Appearance of IPA-PSI gel.

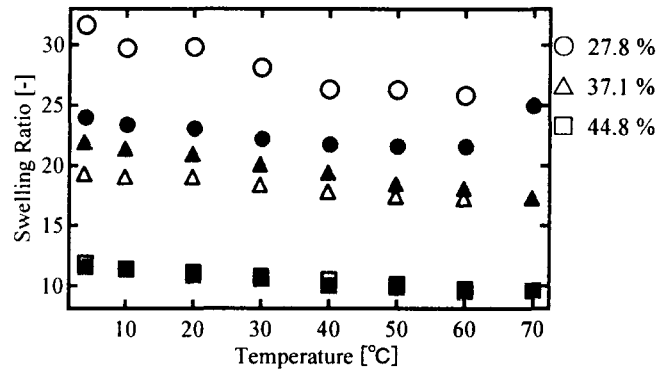


Fig. 4 Effect of crosslinkage density on thermo-induced volume phase transition. Closed key : Heating process, Open key : Cooling process.

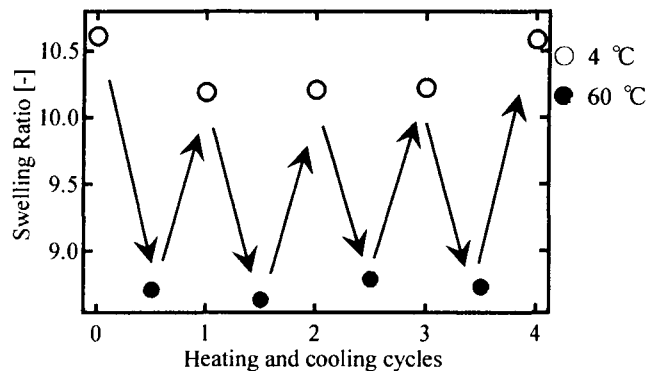


Fig. 5 Swelling ratio change of IPA-PSI gel in repeated temperature stimuli.

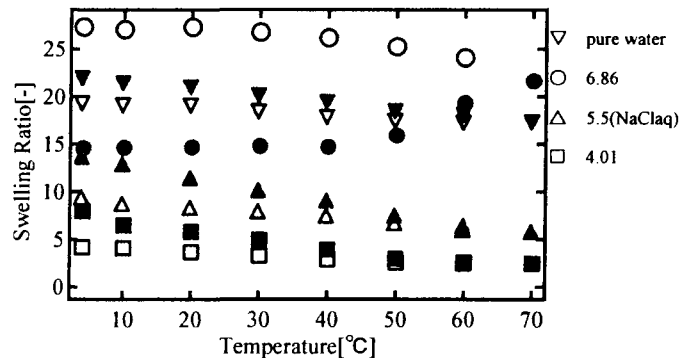


Fig. 6 Effect of pH on thermo-induced volume phase transition. Closed key : Heating process, Open key : Cooling process.

とがわかる。

基準とした架橋密度 37.1%のゲルを用いて、pH の異なる緩衝液中で温度応答性評価を行った結果を Fig. 6 に示す。ただし pH5.5 の溶液は NaCl 水溶液である。いずれの場合も 4 °C の時点では純水の場合よりも膨潤度は小さかった。また、この図から溶液の pH が低いほど膨潤度は小さく、加熱による収縮が大きくなる傾向が見られた。これは後に示す pH の影響で、水溶液中に存在する水素イオンが関連していると考えられる。pH6.86 において加熱により膨潤が起る原因は、イミド環の開環によるものと考えられる。

架橋密度 44.8 % のゲルの親水性を増加させるため high-IPA-PSI : low-IPA-PSI の混合比を 3 : 1 としてゲルの調製を行った。なおゲルの強度を保つため架橋密度は 60.0 % まで増加させた。その結果 Fig. 7 に示すように混合比 1.8 : 1 のゲルに比べ膨潤度・収縮率が大きく、可逆的体積相転移を示すゲルの調製に成功した。

このゲルを用いて pH・塩濃度に対する応答性をそれぞれ HCl 水溶液中、NaCl 水溶液中で観察した。すると pH が小さくなるにつれゲルの体積が減少した(Fig. 8)。これは溶液中に存在する水素イオンが増加するにつれ、ゲル分子内の解離基(カルボキシル基)のプロトン化が進行し、高分子鎖間の電荷反発が抑制され収縮が起こりやすくなったため考えられる。また塩濃度の増加に伴いゲルの体積は減少した(Fig. 9)。これは塩の添加によりゲルに水和している水分子が脱水とされ、ゲルが疎水的になることで収縮が起きたと考えられる。しかし、可逆性や再現性の確認などは今後の検討課題である。

4 結言

IPA-PSI にジアミンを反応させることによるゲルの調製に成功した。また側鎖導入率の異なる 2 種の IPA-PSI を用いることで可逆的な体積相転移を示す IPA-PSI 複合ゲルの調製に成功した。しかし、高温時の収縮率は既往の温度応答性ゲルに比べ小さいため、今後更なる検討が必要である。

high-IPA-PSI/low-IPA-PSI 複合ゲルの収縮率は架橋密度、high-IPA-PSI : low-IPA-PSI 混合比に影響を受けた。温度以外の外部環境(pH, イオン強度)の変化によってもゲルの体積は大きく変化した。

参考文献

- Xue-Yong Liu *et al.* (2004): Fabrication of Temperature-Sensitive Imprinted Polymer Hydrogel, *Macromol Biosci.*, 4, pp. 412-415
 吉澤ら, (2003) : 熱誘起相転移を示す新規な生分解性水溶性高分子の創製, 化学工学会第 68 年会要旨集 I107, pp. 303

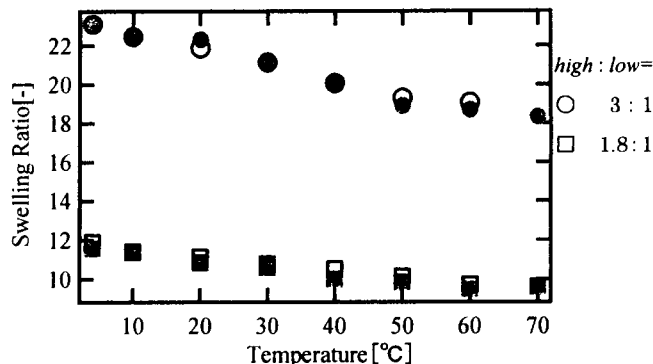


Fig. 7 Effect of high-IPA-PSI/low-IPA-PSI ratio on swelling ratio. Closed key : Heating process, Open key : Cooling process.

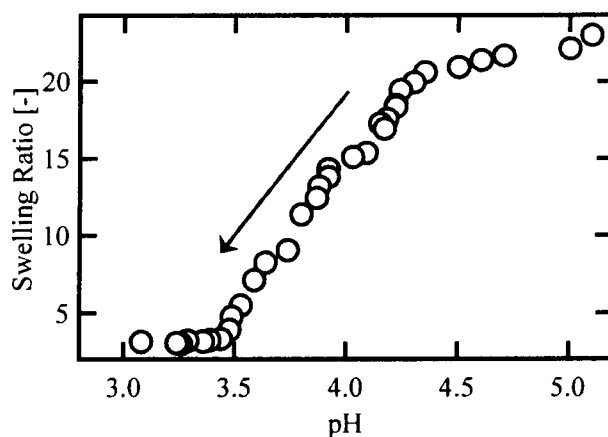


Fig. 8 Effect of pH on swelling ratio in HCl solution.

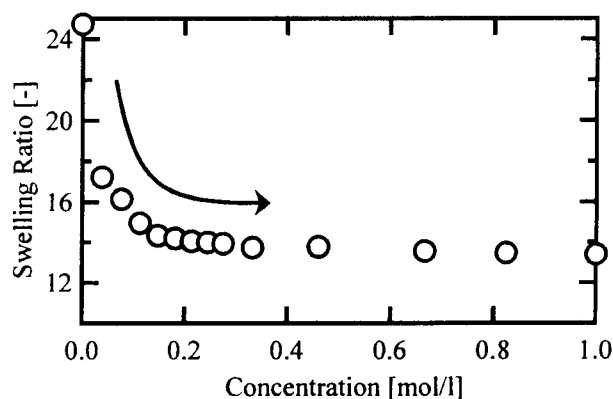


Fig. 9 Effect of concentration of salt on swelling ratio in NaCl solution.