

## 自己修復テンプレートによるゲルの自由自在な形状構築法の新規開発

著者	佐藤 健
発行年	2017
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2016
報告番号	12102甲第8053号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00148227">http://hdl.handle.net/2241/00148227</a>

筑波大学大学院博士課程

数理物質科学研究科博士論文

博士（工学）

自己修復テンプレートによるゲルの自由自在な  
形状構築法の新規開発

佐藤 健

物質・材料工学専攻

# 目次

第1章	1
1.1. ハイドロゲル：開発の歴史と学術的な立ち位置	2
1.2. ハイドロゲル：医療への応用	3
1.2.1 薬物徐放担体としての応用	3
1.2.1.1. インジェクタブルゲル	5
1.2.1.2. ナノゲル	6
1.2.2. アクチュエーターとしての応用	10
1.2.3 細胞培養基材としての応用	11
1.3. ハイドロゲルの加工	13
1.3.1. 光リソグラフィーによるゲルの微細加工	14
1.3.2. マイクロ流路を用いたゲルの加工法	14
1.3.3. 粘稠水溶液のカクテル構造を用いた積層法	15
1.3.4. 3Dプリンターを用いたゲルの構築法	16
1.4. 本論文の主題と構成	16
1.5. 参考文献	17
第2章	20
2.1. 緒言	21
2.1.2. 自己修復材料の歴史	22
2.2. 自己修復ハイドロゲルを構築する動的架橋メカニズム	23
2.2.1. Host guest 相互作用	24
2.2.2. 静電相互作用	24
2.2.3. 有機金属錯体を架橋点とした自己修復ゲル	24
2.3. 実験	25
2.3.1 本実験の概要	25
2.3.2. 4-arm PEG-phos の合成	25
2.3.3. 4-arm PEG-phos の導入率評価	26
2.3.4. ハイドロゲルの作製	26
2.3.5. 動的粘弾性測定を用いたハイドロゲルの力学測定	26
2.3.6. 4-arm PEG-phos を架橋する金属イオンが持つべき条件の予想	26
2.4. 結果および考察	27

2.4.1. 合成した 4-arm PEG-phos の導入率評価 .....	27
2.4.2. 4-arm PEG-phos と金属イオン水溶液の混合によるゲル化の確認 .....	27
2.4.3. 金属イオンで架橋した 4-arm PEG-phos ゲルの自己修復特性の確認 .....	29
2.4.4. 4-arm PEG-phos の架橋に寄与する金属イオンが持つ条件 .....	32
2.4.4.1 錯体形成に寄与するクーロン力の考察 .....	32
2.4.4.2 配位子置換速度と架橋点の形成の関係 .....	33
2.4.4.2 架橋に与る金属イオンの酸化還元によるゾルゲル転移挙動 .....	35
2.5. 結言 .....	36
2.7 参考文献 .....	38
第 3 章 .....	40
3.1. 緒言 .....	41
3.2 ハイドロゲルの機能化 .....	42
3.2.1 ミクロスコピックなゲルの機能化 .....	42
3.2.1.1 ゲルのネットワークの骨格となるポリマーの機能化 .....	42
3.2.1.2 ゲルの架橋点の機能化 .....	43
3.2.2 マクロスコピックなゲルの機能化 .....	44
3.3. 自己修復ゲルの直接的な医用応用例 .....	44
3.4. 実験 .....	46
3.4.1. 本実験の概要 .....	46
3.4.2. SHT の合成 .....	46
3.4.2.1. PEGDA の合成 .....	46
3.4.2.2 PNHA の合成 .....	46
3.4.3. SHT の光架橋 .....	47
3.4.4. サンプルの引張試験 .....	47
3.4.5 架橋した PNHA ゲルの温度応答性 .....	47
3.4.6 SHT から合成した PEGDA ゲル、PNHA ゲルのヘマトキシリン染色 .....	47
3.5. 結果と考察 .....	48
3.5.1. SHT を架橋する金属イオンの選定と修復性 .....	48
3.5.2. SHT のテンプレートとしての性能評価 .....	48
3.5.3. SHT 法による異なる分子量を有する PEGDA ゲルの貼合わせ .....	51
3.5.4. SHT 法による異なる高分子ゲルの貼合わせ .....	52

3.5.5. SHT を用いて作製したゲルと溶液から作製したゲルの相違点 .....	52
3.6. 結言 .....	54
3.7.参考文献 .....	55
第 4 章.....	57
4.1 緒言 .....	58
4.1.2. ハイドロゲルを母材としたデバイス開発.....	58
4.1.2.1. 薬物、細胞の担体.....	58
4.1.2.2. ソフトアクチュエーター .....	59
4.2. 実験 .....	59
4.2.1. 箱型ゲルの作製 .....	59
4.2.2. 箱型ゲル内の pH 測定.....	60
4.2.3. ゲルボックス内での NIH3T3 の生存率の確認 .....	60
4.2.4. キャピラリー状ゲルの作製.....	60
4.2.5. キャピラリーゲルの熱駆動試験.....	60
4.3. 結果と考察.....	61
4.3.1. 箱型ゲル作製 .....	61
4.3.2. 箱型ゲル内部の溶液、細胞の保存能.....	62
4.3.3. キャピラリー状のアクチュエーターの性能評価 .....	64
4.4. 結論 .....	66
4.5. 参考文献 .....	67
第 5 章.....	68
5.1 緒言 .....	69
5.1.1. ヒアルロン酸.....	69
5.1.2. PBA-diol 結合を利用した機能性ハイドロゲル .....	70
5.1.3. PBA と相互作用するジオール化合物 .....	71
5.2. 高分子の機能化に対する Catechol 基の役割 .....	71
5.2.1. Catechol 基の酸化に伴う超分子形成 .....	71
5.2.2. L-DOPA と特定のイオン、官能基との相互作用の応用.....	72
5.3. 実験 .....	72
5.3.1. 実験概要 .....	72
5.3.2. ヒアルロン酸誘導体の合成.....	72

5.3.2.1. HA-CA の合成 .....	72
5.3.2.2. HA-PBA の合成 .....	73
5.3.2. ヒアルロン酸誘導体の構造同定.....	73
5.3.3. ヒアルロン酸を骨格とする自己修復ゲルの合成 .....	73
5.3.4. ゲルの動的粘弾性測定；修復挙動観察 .....	73
5.3.5. ゲルの動的粘弾性測定；時間経過による HA-CA のゲル化挙動の観察 .....	73
5.3.6. HA-CA 側鎖の catechol 基の二量体形成の測定.....	73
5.3.7. HA-CA 水溶液の可視光による光架橋 .....	74
5.3.7.光架橋後の HA-CA ゲルの力学強度評価.....	74
5.3.8.HA-CA ゲルの組織接着の評価.....	74
5.4. 結果と考察.....	74
5.4.1. ヒアルロン酸誘導体の構造同定.....	74
5.4.2. HA-PBA/HA-CA から成る自己修復ゲルの力学強度測定 .....	75
5.4.3. 酸化によって起こる HA-CA の架橋挙動の測定 .....	76
5.4.4. HA-CA の架橋における pH の影響.....	78
5.4.5. 可視光を使用した HA-CA の光架橋 .....	82
5.4.6. HA-CA を用いた組織接着評価.....	84
5.5. 結言 .....	85
5.6. 参考文献 .....	87
第 6 章.....	89
【発表リスト】 .....	93
【発表論文】 .....	93
【国際学会における研究発表】 .....	93
【国内学会における研究発表】 .....	94
【受賞歴等】 .....	96
【その他】 .....	96
【謝辞】 .....	97

## 第 1 章

### 緒言

## 1.1. ハイドロゲル：開発の歴史と学術的な立ち位置

高分子は溶媒に対して親和性を持っていれば溶解する。しかしながら、高分子鎖同士を化学的、もしくは物理的に架橋することで、良溶媒に対して不溶のゲルとなる。工業的にゲルが広く注目されたのは、およそ 180 年前にグッドイヤーが開発したゴムの加硫による架橋の後であるとされている。このグッドイヤーの発見は、架橋ゴムという形状記憶能を有する高機能のゲルの開発をもたらした。この架橋ゴムは現在においても、例えばタイヤなどの工業用品の製造を支える技術の基礎として用いられる重要な材料となっている。高分子鎖同士を架橋するグッドイヤーの発見に端を発したゲル開発は、その後、食品、医療、化粧品などの広い分野にわたって利用されている。とりわけ、ハイドロゲルの構造的特徴である三次元網目を利用した、高い物質の保持機能と徐放性を利用した製品が開発され続けており、ハイドロゲル材料による製品の高機能化が進んでいる。

現在、はわれわれの生活に欠かせない材料であるハイドロゲルであるが、学問の観点からみると、半世紀ほど前まではゲルの物理化学的特性に対する評価体系が確立しておらず、むしろポリマーの合成過程で生じるゲル化現象がネガティブな結果として報告されることの方が多かった。しかしながら Flory<sup>1,2</sup>、Stockmayer<sup>3</sup>、田中豊一<sup>4</sup>らによる詳細な理論証明・物性評価を皮切りに、ゲル研究は瞬く間に高分子研究の中の主要な学問の一つとなった。ハイドロゲル研究の特徴としては高分子科学の分野において、合成、構造解析、物性評価、応用といった非常に広い分野にまたがった研究が数々の科学者によってなされている点である。したがって、高分子合成、生物学、医学、薬学などの広い研究領域に対してゲルが新たな研究題材を提供し、先端的な研究を可能としてきた。

以上のように、学術的な側面にも応用的な側面にも焦点が当たる中で、新しいハイドロゲルの架橋点や架橋様式の発見や、先進的な高分子研究により開発されたスマートポリマーとの協働によって今まで開発が困難であるとされた高機能ハイドロゲルが開発されている。たとえば、温度や pH などの外部環境に応答して相転移を示す刺激応答性ゲル<sup>5</sup>、ゴムのような強度と柔軟性を持つ超高強度ゲル<sup>6</sup>、傷や破断を自らで修復する自己修復ゲル<sup>7,9</sup>など、今までのゲルの物性や性質に対しての既成概念を覆すハイドロゲルが開発されてきている。これらのゲルはスマートゲルと呼ばれ、ハイドロゲル開発の花形となっている。また、ハイドロゲルには人体の軟組織と類似した点が多くみられる<sup>10</sup>ことから、バイオ・医療領域への応用が盛んに行われている。例えば、細胞を取り囲むように存在する細胞外マトリックス(Extra cellular matrix: ECM)と呼ばれる超分子は全質量のおよそ 60%以上を水分が占めており、この構造と水分組成、さらには力学的強度がハイドロゲルのそれと極めて類似している<sup>11</sup>。このような生体構造類似性も相まり、ハイドロゲルは欠損組織の代替材料や<sup>12</sup>、再生医療用の足場材料<sup>10</sup>、薬剤を担持させるドラッグ・デリバリー・システム(DDS)用カプセルなど、医療材料分野での研究開発が活発になっている。

このようなゲルの様々な分野への応用を考える際、任意形状への加工や異種ゲルとの接合など複雑な構造体の構築が欠かせない。現在多くのゲルは、ビーズ、円柱、平板など単純なものが多く、複雑な形状を有するものは少ない。その主な理由として、ゲルが柔らかく脆いため、架橋後の加工が難しく、また加工前においてもその前駆体が水溶液であるため作製の際に三次元方向に積層することが難しい点が挙げられる。この問題点を克服するために、ゲルの作製工程で 3D プリンターや光リソグラフィー<sup>13</sup>を用いてゲルを加工する方法が開発されている。これらの方法は作製に時間やコストがかかるうえ、複数の組成を一つのゲルに組み込むことも困難である。例えば現在開発されているバスタブ型の 3D ゲルプリンターは、バスタブ内がゲルの前駆体水溶液で満たされており、光ファイバーを用いて局所的に光架橋を行うことで微細なゲルの作製が可能となっている。前駆溶液に光を当てる時間を加減し、ゲルの架橋密度を変えることで局所的にゲルの硬さを調節することはできるが、むしろゲルネットワークを構築するポリマーの種類を変えることはできない。

こうした背景のもと、本研究では独自に開発した自己修復ゲルをテンプレート(self-healing



template: SHT)として用いることで、ハイドロゲルを目的に応じた形状と組成で構築する三次元法(自己修復テンプレート法)を確立し、医療から産業まで幅広い分野にわたりゲルデバイスの開発をさらに加速させることを主題とした。本論文の報告では、キーマテリアルとなる SHT の開発と、自己修復テンプレート法(SHT 法)による任意形状ゲルの作製とその応用を報告した。

## 1.2. ハイドロゲル：医療への応用

ハイドロゲルの特徴として力学的な強度と含水率が人体の軟組織と似ている点あげられる。ハイドロゲルは、この性質によって生体内にて使用する際の、生体へのなじみやすさ、いわゆる生体適合性が高いことが知られている。また、材料表面が強く水和されているものが多く、多量に存在する中間水により生体の異物反応のきっかけとなるタンパク質吸着が抑制できる<sup>14</sup>ということも高い生体親和性を示す要因となっている。

上述の生体親和性、すなわち人体の軟組織に対してのなじみやすさと、異物反応を抑制する化学的な特性によって、ハイドロゲルは長らく医療材料として研究され、実用されてきた。とくに、優れた柔軟性と透明性を利用した、ソフトコンタクトレンズの開発と実用化は、ハイドロゲルが医療用の主力材料の一つとなるきっかけであったと考えられる。

### 1.2.1 薬物徐放担体としての応用

薬と毒は表裏一体の性質を持つ。適切な用法と容量を守った際に、特定の症状を抑え、改善する化学物質であり、不適当な方法で摂取した場合は人体に害を与える。適切な用法と容量であるとされる範囲で投薬を行った場合であっても、人体に対して悪影響を及ぼす場合があり、これを副作用という。投薬は長らく薬物の経口投与や注射投与に頼ってきた。そのため薬剤は小腸からの吸収、または血管への直接的な注射によって全身をめぐる。さらに薬物は速やかに肝臓の代謝などによって薬効を失う。すなわち、従来の方法を用いた場合、投与された薬剤は、その投与量のごく一部のみが患部に作用し、正常細胞に対しての副作用をもたらす。投薬の最も効率の良い方法は「必要最小限の薬物を必要な場所に必要な時に供給する」ことである。この要求に合う方法が薬物徐放をはじめとするドラッグデリバリーシステム(drug delivery system; DDS)である<sup>15</sup>。この DDS の概念は Alza 社の A.Zaffaroni によって約 40 年前に提唱され、Utah 大学の Higuchi と共同で 1974 年に初めて臨床応用(緑内障治療薬 pilocarpine を徐放する眼内挿入レンズ; Ocusert システム)が行われて以来、投薬に欠かせない方法の一つとなった。現在の市場規模は 1800 億ドルという巨大な市場になっており、現在も目覚ましい発展を遂げている。上記 Ocusert システム以外にも我々の身近に身近な DDS の例として、湿布薬は経皮吸収システム(transdermal therapeutic system, TTS)を用いた DDS の好例である。さらに近年では禁煙治療の助剤としてニコチネル TTS などの禁煙パッチも販売されており、病気の投薬治療のみならず、さまざまなシーンで DDS が用いられるようになってきている。この DDS の中で、薬物徐放は広く用いられる手法の一つであり、薬物を患部に挿入もしくは貼り付けた担体から薬物を穏やかに放出することができる。すなわち薬剤の体内における滞留性を向上させ、副作用を示さない適切な濃度を長期にわたって保つことができる。この方法によって、副作用の低減のみならず薬剤の投与回数を減らすこともできるため、患者への負担を減らすことができる。注射投与によって体内に注射された場合と薬物徐放によって投薬された場合の患部におけるそれぞれの薬物濃度の推移を示すグラフを Figure 1-1 に示す<sup>15</sup>。注射投与によって患部に注射された薬物は急激な濃度上昇を示し、毒性を表す濃度まで到達したのち、速やかに減少する挙動がみられる一方で、徐放担体に封入した薬剤を患部に挿入する薬物徐放を用いた場合では、薬物濃度が薬効を示す適切な濃度を長時間保つことが確認された。このように、薬剤を適切な徐放担体に封入した場合、体内において薬物の滞留性を向上させ、副作用の低減と、薬効の持続性の両方を担保することがで

きるようになる。

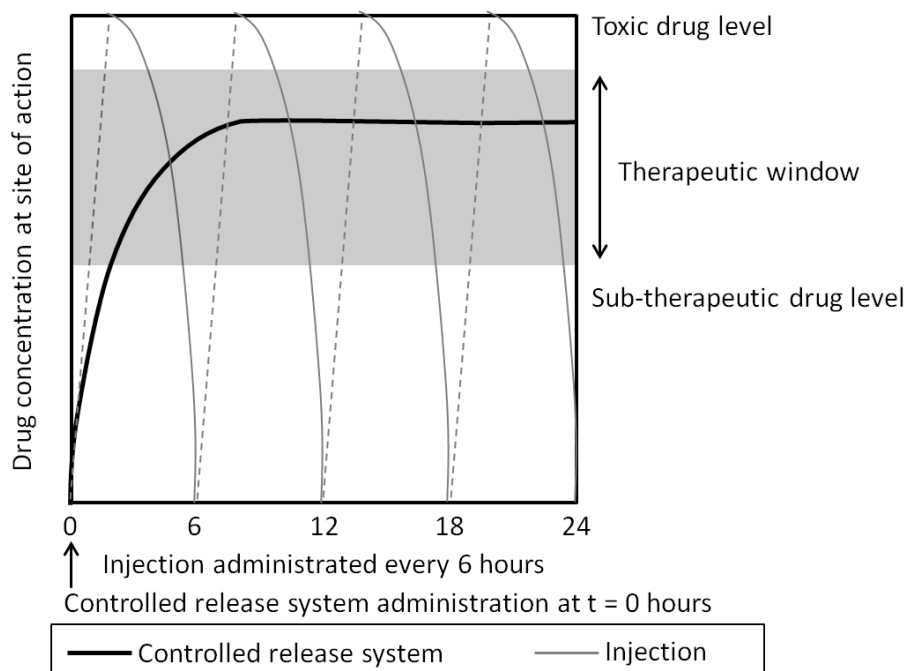


Figure 1-1. Drug concentrations at site of therapeutic action after delivery as a conventional injection (thin gray line) and as a temporal controlled release system (bold black line).<sup>15</sup>

DDS の担体として求められる性質は、薬剤を安定して内包でき、内包した薬剤が患部において薬剤を徐放し、担体自体およびその分解物が生体に対して毒性を示さないことである。上記三点の条件を満たす材料として、ハイドロゲルが最も一般的に用いられる。ハイドロゲルは高分子によって構築された三次元網目構造体であり、その網目の内部に溶媒を含めて薬剤を担持することができる。ゲルの緻密な網目構造によって内包された薬剤の系外への拡散が低減されるため、溶媒に分散させた場合と比較すると、投与部位における薬物濃度の上昇が大幅に抑えられる。結果として薬剤が安定的に薬効濃度を示すのである。また、ハイドロゲルを構築する高分子は親水性であり、ゲル表面に不透水が多量に結合している。これによって親水性を示すハイドロゲルの表面は、生体の異物反応のきっかけとなるタンパク質の吸着を抑えることができる。そのため、体内に挿入されたハイドロゲルに対して生体が拒否反応を示すことなく親和性高く存在することができる。さらにヒアルロン酸、アルギン酸、コラーゲンなどの生体高分子やポリ乳酸と poly(ethylene glycol) のブロック共重合体など一部の高分子のハイドロゲルは生体内において代謝分解され、分解物の毒性も確認されないことから、非常に有用な DDS 担体として機能することが期待される。

このようにハイドロゲルは優れた薬物徐放担体としての機能を持つ一方で、固体であるため、一定以上の大きさを持つハイドロゲルの体内挿入には外科手術が必要である。むろん外科手術は患者への負担が大きく傷から感染症を引き起こす可能性も考えられるため、現実的な方法ではない。侵襲性を最小限に抑えて血中や皮下にハイドロゲルを挿入するためには注射器を用いるのが最も適しており、その要求に適う方法論が多く研究者たちによって追及されてきた。ゲルを注射器によって挿入する方法は大別すると「前駆体を体内でゲル化させる方法」と「注射器を通るサイズでゲルを作製する方法」である。次項にてハイドロゲルの低侵襲的な挿入方法を詳しく述べていく。

### 1.2.1.1. インジェクタブルゲル

インジェクタブルゲルとは文字通り注射器によって注射可能なハイドロゲルであり、一般的にその前駆体は溶液状で体内に注射した後に架橋してハイドロゲルとなる物質を指す。インジェクタブルゲルを構築するために用いられるシステムは「温度応答によるゲル化」「二液混合によるゲル化」「注射後の溶液のラジカル重合によるゲル化」に大別することができる。上記システムにはそれぞれ一長一短が存在するが、細胞親和性の高さに着目した場合は「温度応答によるゲル化」と「二液混合によるゲル化」が有力な方法である。

#### 1.2.1.1.1. 二液混合によるゲル化

二種のポリマー溶液をまたはポリマー溶液と架橋剤溶液を混合して、物理架橋によってハイドロゲルを構築する方法が存在する。Figure 1-2 に示すような D 体の乳酸と L 体の乳酸の間で生じるステレオコンプレックス(SC)、アルギニン酸と  $\text{Ca}^{2+}$  間で生じる金属錯体の形成などを駆動力とした研究例が多く報告されている。それぞれ分けられた二液を注射の際に混合することによって二液間で架橋を起こし体内で速やかにゲル化させる手法である。ゲル化は物理架橋に頼っているため、有毒になりうるゲル化剤を使用する必要がなく、生体親和性が極めて高い注射方法であるといえる。一方で、注射の際に Y 字管などを用いて等量の溶液を適切に混ぜ合わせるために工夫が必要であり、操作が煩雑になる可能性が考えられる。

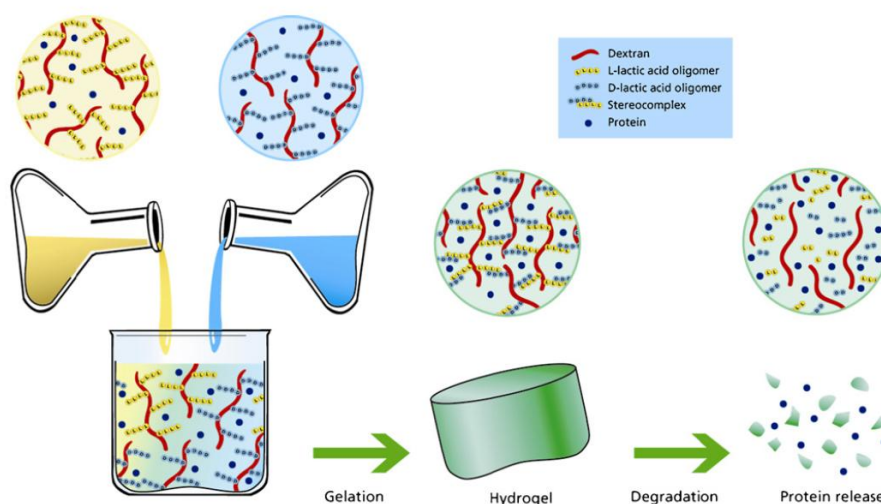


Figure 1-2. Schematic presentation of the concept of the self-assembling stereocomplexed dextran hydrogel (reprinted from)<sup>16</sup>.

#### 1.2.1.1.2. 温度応答によるゲル化

親水性セグメントと疎水性のセグメントから構成された PEO-PPO-PEO ブロックコポリマー(ポロキサマーまたは pluronic)は、温度応答によって低温ではゾル、高温ではゲルになることが知られている。このゲル化の駆動力は疎水性相互作用であり、体内に注射すると速やかにハイドロゲルに相転移する。このポロキサマーは生体適合性が高く、化粧品の乳化剤や医療に対して広く応用されているが、インジェクタブルゲルとしての応用を考えると、生分解性に乏しく体内に長期間残留してしまう恐れがある。1997年に Jeong らによって PEO-PLLA-PEO triblock copolymer を原料とする BAB 型トリブロックコポリマー水溶液を用いたインジェクタブルゲルが開発された<sup>17</sup>。この水溶液は 45°C においてゾル状で、体温付近においてゲル状に架橋されるという温度降下に応答するゾル

ゲル転移挙動を示した。加えて PLLA のブロックは生体中で加水分解されるため、ゲルが経時的に分解、排泄される特性を持っている。そのため、ゲルの崩壊およびネットワークの網目からの薬物の拡散に伴って内包されている薬剤が徐放される。注射後、不要となったハイドロゲルは分解、排泄されるため、薬物治療後に残ったハイドロゲルを取り出す必要がないため、薬物治療の一連のプロセスにかかる手間とコストが低いことも魅力的である。この報告例では、ハイドロゲルは高温から生体温度付近の低温にシフトすることによってゲル化することが報告されていたが、Kimらによって ABA トリブロックコポリマー(PLLA-PEG-PLLA)が開発された<sup>18</sup>。この共重合体は温度上昇に伴ってゲル化し、低温域ではゾル、体温付近の温度に昇温させるとゲル化が観察されている。ABA トリブロック共重合体は水に溶解させると PLLA をコア、PEG をシェルとしたミセルを形成する。温度上昇に伴って PEG の部分的な脱水和が起こり、ミセルが不安定化する。不安定化に伴い、PLLA がコアから解離し、解離したダングリング鎖が別のミセルのコアに再結合することによってミセル間での架橋が起こる。この架橋によってネットワークが形成され昇温に伴う架橋が完結すると考えられている<sup>19</sup>。上記いずれの例においてもハイドロゲルの力学的な強度に関しては改善の余地があり、一般的に力学的な強度がおおむね 100 Pa 前後であるという報告がなされている。体内に挿入した場合はねじりや圧力を受けるため、ゲルの強度が弱いと体の動きに追従する過程で破壊が起こる可能性がある。強度を上げるためには共重合体の分子量を増大させる必要があるが、腎系球体を介した腎排泄が速やかに行われるためには PEG の分子量が 20,000 程度であることが望ましい。PEG セグメントの分子量を増大させることなく、力学的な強度を増大させるための戦略として、高分岐ポリマーを用いる方法と 1.2.1.1.1.において述べた SC と疎水性相互作用とを組み合わせた架橋様式にすることによってハイドロゲルをより強固にする手法が開発されている。

木村らは直鎖型 PLLA-PEG-PLLA と PDLA-PEG-PDLA の二液混合による SC 形成を利用したインジェクタブルゲルを開発した<sup>20</sup>。むしろ PDLA-PEG-PDLA 自体も温度上昇に伴うゲル化挙動を示す。それぞれの溶液は等しく水に溶かした場合にミセルを形成するが、二液を混合して昇温させるとミセル同士の結合が起こりゲル化する。木村らはまた、X 線散乱測定によって、ミセルのコア部分に SC が形成されているということを確認している。すなわち、今まで疎水性相互作用のみに頼っていた架橋様式に対して SC 形成という多点結合を導入できたことを示唆する結果であった。動的粘弾性測定によって、この 10wt% 溶液から成る SC ゲルは貯蔵弾性率が 900 Pa と従来のゲルと比較して 9 倍程度の強度増加を示した。長濱らは 8 分岐型の PEG (8-arms PEG) を用いて同様の SC 形成を駆動力とするインジェクタブルゲルの開発に成功している。8-arms PEG の水酸基末端に対して L-LA もしくは D-LA を開環重合し、さらに PLA の末端にメトキシ基末端 PEG (m-PEG) を結合させ、8-arms PEG-PLLA-PEG と 8-arms PEG-PDLA-PEG を合成し、それぞれの 10 wt% 溶液を混合し、昇温させたところ、貯蔵弾性率 10,300 Pa を示すハイドロゲルの合成に成功している<sup>21-22</sup>。

以上のように、前駆体水溶液を SC 形成や温度応答によって架橋することで、注射針から人体に注入できるハイドロゲルが開発されており、薬物徐放担体のみならず、再生医療のための細胞培養足場材料としての応用が期待されている。

### 1.2.1.2. ナノゲル

粒径の小さなハイドロゲルを作製することも、注射器を用いてハイドロゲルを体内に注射するための手法として優れている。ハイドロゲルを微粒子化して、一つ一つのサイズを小さくすることで得られる利点としては、これだけではなく、外部刺激への応答性が上がることも挙げられる。一般的にハイドロゲル微粒子が外部刺激に応答する速度は、粒径のマイナス 2 乗に比例するといわれている。すなわち、温度応答や pH 応答を示すハイドロゲルに薬物を内包させた場合などは、粒径が小さいほど鋭敏な薬物放出を行うことができるということである。ナノゲルの作製は、ゲルの塊を

砕いて微粒子にしていくトップダウン法とモノマーを自己集積させてゲル微粒子を作製するボトムアップ法の二通りの方法が知られている。トップダウン法を用いるとゲルの粒径を均一に揃えることが難しいため、一般的にナノゲルの作製にはボトムアップ法が用いられる。

ボトムアップ法の主流として、モノマーを含むエマルジョンを重合(エマルジョン重合)したり、シード重合によってゲルのコアとなる微粒子の周りにゲルをコーティングしたり、または疎水性ドメインを側鎖にぶら下げた直鎖状のポリマーの水中での自己会合などの方法がとられている。ボトムアップのナノゲル形成に関しても化学架橋と物理架橋が存在する。

#### 1.2.1.2.1. 物理架橋ナノゲル

自己会合の駆動力としては一般的に疎水性相互作用が用いられており、疎水性相互作用を物理架橋点としてゲルを構築することに鑑みるとミセルも広義のナノゲルの一つであると考えられる。例えば秋吉らによって開発されたプルランの側鎖にコレステロールを導入したポリマー<sup>23</sup>は、数ユニットが会合し、ミセルのコア部分と類似の構造を持つ架橋点によって架橋されたナノゲルを形成することが知られている(Figure 1-3)。架橋点には疎水性の薬剤を内包させることも可能であり、薬物の担持に対して、薬物の親・疎水を選ばないことも一つの大きな魅力である。さらに、このコレステロール基はシクロデキストリンと包摂錯体を形成するため、架橋点をシクロデキストリンの導入によって崩壊させることができる。したがってナノゲルをシクロデキストリンの添加によって任意に崩壊させることができる。このシステムは広義の刺激応用であり、ナノゲル内に内包していたタンパク質などを所定の位置で制御放出することが可能であるため、タンパク質の DDS に対して期待される技術である。

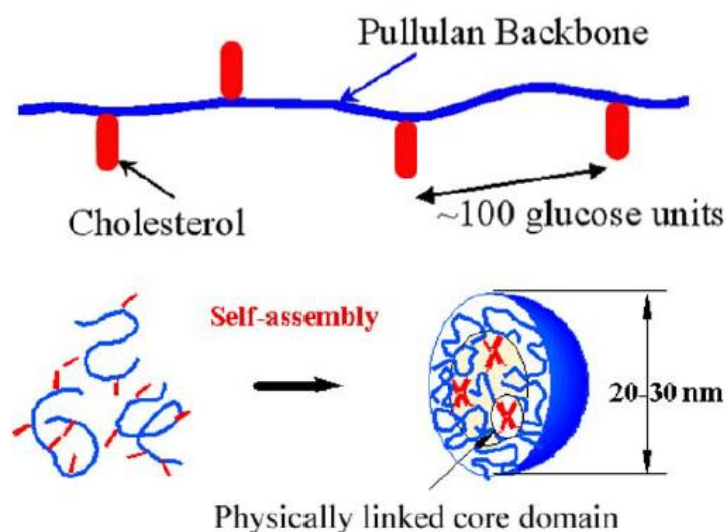


Figure 1-3. Schematic depiction of a cholesterol-bearing pullulan (CHP) and the hydrogel nanoparticle formed by self-aggregation in an aqueous solution<sup>24</sup>.

#### 1.2.1.2.1. 化学架橋ナノゲル

ナノゲルを化学架橋によって形成する方法は、ポリマーの自己集積と異なり、あらかじめ前駆体の溶液を所定のサイズに調整してから架橋することができるため、サイズ制御が比較的容易な手法として広く用いられている。1.2.1.2.で述べたように、乳化重合、シード重合で作製できるほか、鋳

型の微細加工技術が発展したことをきっかけに、トップダウン法と光架橋を組み合わせることでナノゲルが作製できるようになっている。最も簡便で一般的とされるのが、エマルジョンにしたモノマー前駆溶液を重合させる手法(乳化重合)である(Figure 1-4)。水相、油相のどちらかにモノマーを溶解し、界面活性剤を加えて激しく攪拌して o/w もしくは w/o エマルジョンを調整する。それぞれナノサイズに隔離されたエマルジョン粒子内においてモノマーを重合させることでハイドロゲルを調整することが可能である。このゲルの粒径は膨潤の度合いによるが、エマルジョンのサイズにおおむね一致しており、ナノゲル作製初期段階におけるエマルジョンのサイズを変化させることで任意のサイズのナノゲルを目的に応じて調整することができる。さらに、オルガノゲル、ハイドロゲルそれぞれの作り分けができる点も魅力的な手法といえる。

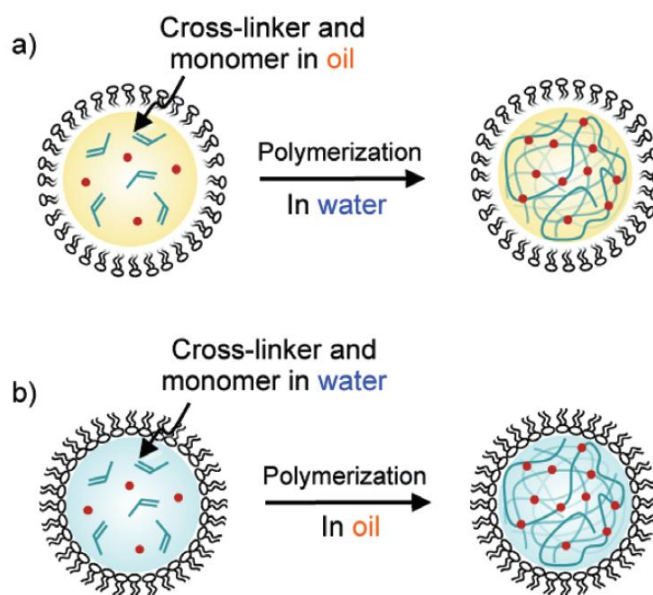


Figure 1-4. Nanogel preparation by emulsion polymerization: a) with emulsion, b) without emulsion<sup>25</sup>.

物理架橋と化学架橋を組み合わせることでナノゲルを調整できる。両親媒性のブロックコポリマーを水中で会合させた後、コア、もしくはシェルのいずれかを化学架橋してナノゲルを作製する手法も報告されている。Figure 1-5 に示すように、一度両親媒性ポリマーを会合させた後、特定の官能基同士を架橋する方式である。カルボジイミド基と二級アミンの結合、クリック反応、光架橋など種々の架橋様式によってミセルを架橋して粒径が均一なハイドロゲルの調整が報告されている。さらに、架橋点にジスルフィド結合などの酸化還元応答を示す結合を採用し、還元応答により崩壊するハイドロゲルが森本らによって開発されている<sup>26</sup>。このナノゲルは細胞膜内の還元条件で崩壊する遺伝子デリバリーキャリアへの応用が期待されている。

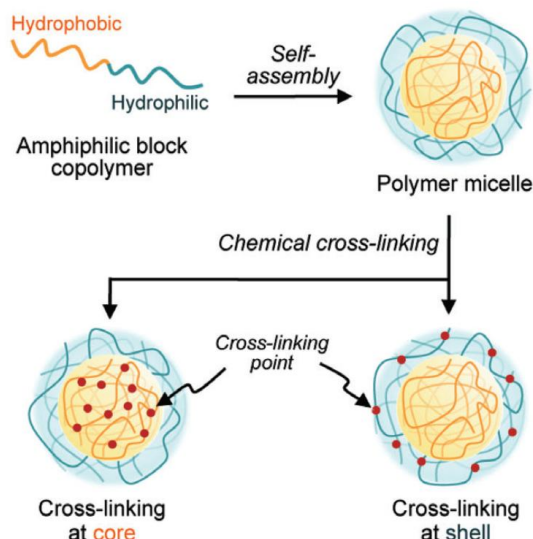


Figure 1-5. Preparation of nanogels by cross-linking of amphiphilic block copolymer at core or shell of the polymer micelles in water<sup>25</sup>.

リポソーム、ポリマーソームを反応場として、その内部でモノマー溶液を重合させてハイドロゲルを作製する方法も確立されている。この方法を用いた場合、ナノゲルのサイズがリポソーム、ポリマーソームの内径に従った大きさに調整できるため、サイズが均一にそろったナノゲルを作製することができる。さらにシード重合によるナノゲル作製によって中空のナノゲルを作製することも可能である。均一のサイズで調整されたシリカ粒子や金粒子の表面においてモノマーを架橋することによって、粒子を覆うようにナノゲルの薄膜を作製することができる。ゲルの架橋後、コア部分に充填されている微粒子をフッ酸、王水などで溶解すると中空のナノゲルを作製することも可能であった。このゲルはナノカプセルとして、薬剤やタンパク質のデリバリーに対しての貢献が期待されている。上記ポリマーソームや微粒子を用いたナノゲル作製の手法をナノテンプレート法と呼び、任意のサイズのナノゲルやナノカプセルを調整する際に大変有用な方法である。

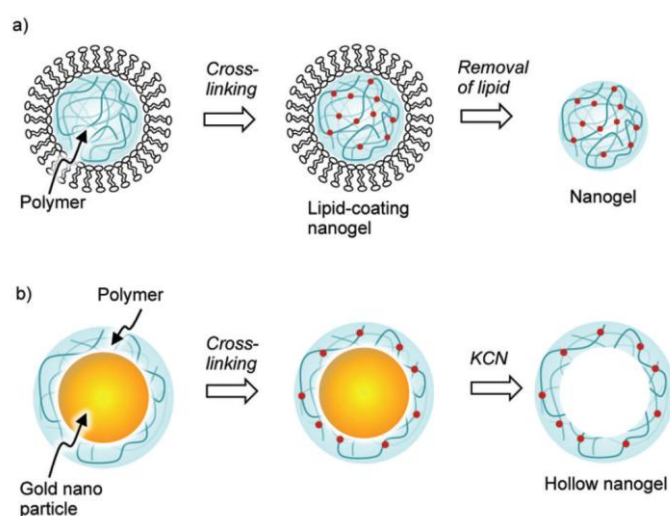


Figure 1-6. Nanogel preparation by nanotemplate methods: a) liposome, b) gold nanoparticle<sup>25</sup>.

1.2.1.2 で述べたようにトップダウン法は粒径の制御が難しいという難点があったが、リソグラフィ技術の進歩に伴ってハイドロゲルの鋳型の微細加工が可能となった。これに従って、微細な鋳型中にモノマー溶液を閉じ込めた後、紫外線を当てることによって鋳型に沿って形成されたナノゲルを光架橋することも可能となっている。ナノゲルの作製手法は Figure 1-7 に示す通りで、鋳型とガラス基板でゲル前駆溶液を挟み込み、ガラス基板側から紫外線を照射することによって光架橋することができるナノプレート同様、ハイドロゲルの粒径を均一に調整することができるうえ、鋳型の形を変えることでハイドロゲルの形状も自由に変化させることができるということが利点である<sup>25</sup>。しかしながら、鋳型を作製するのに時間とコストがかかることと、作製後のハイドロゲルの取り出しが難しいという点が問題点として挙げられ、その点においては未だに改善の余地があると考えられる。

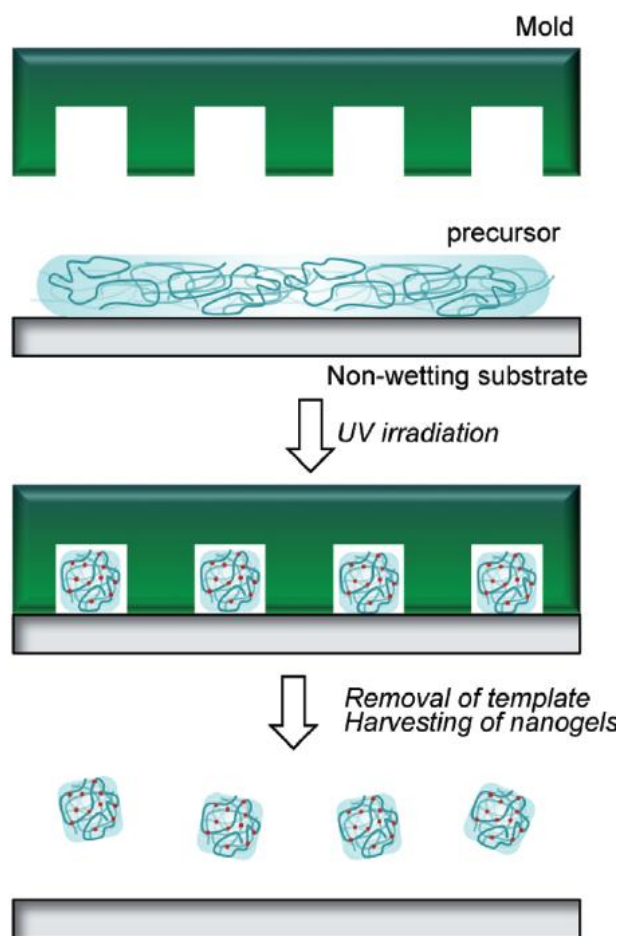


Figure 1-7. Schematic representation of the step and flash imprint lithography (S-FIL) method.<sup>25</sup>

### 1.2.2.アクチュエーターとしての応用

前述したように、ハイドロゲルの構造的、強度的な性質は人体の軟組織と非常に近く、親和性が高いとされている。ハイドロゲルを生体の軟組織周辺に埋植した際は、その周辺組織と親和性良く馴染むことが期待される。筋萎縮性側索硬化症や、事故による半身または全身の付随に対して現在研究が進んでいるのが、脳でコントロールできるロボットアームである。随意筋を動かす際に発生する脳の電気パルスを読み取り、人間が思った通りにロボットアームを動かすことができる技術で



あり、事故、疾病によって体を随意に動かすことができなくなった患者の自立支援に大きな期待が寄せられている。しかしながら、患者は車椅子から降りることはなく、あくまで補助器具を使った移動と操作を行うことができるのみである。人体に埋植し、随意に屈曲と伸長を繰り返すことができる人工筋肉の開発は、身体障害を持つ患者の QOL を飛躍的に高める一つのマテリアルとして注目を集めている。人体に埋植するという観点からも、ヒトの軟組織との親和性が高く、なおかつ埋植部位との馴染みやすさも重要な要素となる。その特長を補完する材料としてはハイドロゲルが非常に有力な候補の一つとして挙げられる。ハイドロゲルの人工筋肉、ソフトアクチュエーターとしての応用は古くから試みられており、例えば長田らは PAMPS の並行平板のハイドロゲルを高分子電解質溶液中に浸漬させ、そのゲルを挟み込むように電圧を当てることで、ハイドロゲルに対して溶液中に分散する高分子電解質が集積する。これによって、ゲルの表面に存在する負電荷が相殺される。この負電荷の相殺によって、ハイドロゲルの膨潤率が下がり、結果として高分子電解質が集積した面に対してゲルが屈曲するという挙動が観察された<sup>27</sup>。これは電気刺激(高分子電解質の電気泳動)を用いてハイドロゲルを屈曲させる例である。また、原田らの研究室では、同様に並行平板のハイドロゲルを水中に保持し、紫外線照射で屈曲、可視光照射で伸長するソフトアクチュエーターを開発している。このソフトアクチュエーターの材料となっているハイドロゲルは、アゾベンゼンを導入したアクリルアミドと  $\beta$  シクロデキストリンを導入したアクリルアミドを予め混合し、両分子間で包摂錯体を形成したのち、それぞれのモノマーを還元重合することによって架橋したゲルである<sup>28</sup>。アゾベンゼンはトランス型が安定であり、紫外線などからエネルギーを受容した場合にシス型へと異性化する。また、可視光のエネルギーを受容することでシス型からトランス型へ異性化するエネルギー障壁を超えることができる。包摂錯体を架橋点として有するハイドロゲルに着目すると、トランス型アゾベンゼンは  $\beta$  シクロデキストリンと包摂錯体を形成する。一方で、シス型アゾベンゼンは  $\beta$  シクロデキストリンと包摂錯体を形成しない。このシス-トランスでの包摂錯形成の有無から、架橋密度が劇的に変化する。むしろ、シス型アゾベンゼンの存在率が多数に及ぶとゲルの架橋密度は下がり、結果としてハイドロゲルが大きく膨潤する。この現象を光駆動型のアクチュエーターとして巧みに活用している例である。紫外線に応答するハイドロゲルアクチュエーターは、包摂錯体の解離と再結合以外にも、pH に応答して親水性と疎水性に相転移する高分子を母材としたハイドロゲルからも作製できる。第 4 章にて詳述するが、紫外線という光による刺激によってハイドロゲルをアクチュエーターとして駆動させる試みがなされている。ハイドロゲルのアクチュエーターを駆動させる方法はこのほかにも多岐にわたる刺激によって検討されており、今後の人工筋肉への転用に期待されている。

### 1.2.3 細胞培養基材としての応用

優れた細胞親和性を有し、その力学的強度を組成によって比較的自由に变化させることができる<sup>29</sup>という観点から、ハイドロゲルは細胞培養足場として広く応用されている。再生医療という概念は、Vacanti, Langer によって提唱された<sup>30</sup>。これは、患者の細胞を体外で増殖させ、組織とした後に患者に移植する方法である。この発表を契機に細胞から人体を創生することで、機能を損失した臓器や、事故などによって欠損した部位を根治、補完する方法として、再生医療という新たな医療領域が提唱された。疾病や事故などによって臓器の機能を損失した場合、根本治療としては臓器移植が一般的な手法である。しかしながら臓器移植はドナーが不足しており、臓器提供を受ける前に死亡する患者も多い。さらに、運よく移植を受けた場合でも、移植した臓器に対する免疫拒絶を抑えるための投薬が不可欠であり、患者の QOL が疾病前まで完全に回復することは少ない。再生医療は、患者の細胞を増殖させ、目的の部位に埋植することで、喪失した機能を回復することが期待される。そのため、ドナーからの臓器提供を待たず、免疫拒絶も少ないという点において、非常に

優れた新しい医療であると考えられる。さらに、この再生医療の研究は山中伸弥教授らが iPS 細胞の開発に成功したことを皮切りに、近年、ますます注目を集めている。

再生医療に用いる組織を創生するためには、細胞を増殖させるための足場が不可欠である。この足場材料として、ハイドロゲルがしばしば用いられてきている。ハイドロゲル特有の三次元網目構造は、組織を構成する細胞外マトリックス(ECM)と構造的に類似しているため、細胞を親和性良く培養することが可能である。また、ゲルに成長因子を内包させておくことで、幹細胞を目的の細胞へと分化させることもできる。さらに、ゲルを構築するポリマーに RGD などの接着タンパク質を修飾させることで、目的の箇所のみ細胞を吸着させるなどし、細胞の密度をゲルの組成によって変化させることも可能である<sup>13</sup>。このようにハイドロゲルは、細胞足場材料として再生医療を長らく支え続けてきた。ハイドロゲルが今まで、再生医療の足場材料としていかに活躍してきたかは、学術論文の発行数を調べることから理解できる。例えば Hydrogel を Tissue engineering に応用した研究論文の報告数は Figure 1-8 A に示すように、2002 年以降から飛躍的に増加していることがわかる。一方で、Figure 1-8 B に Tissue engineering をキーワードとする論文の発行数を示すと、同様に 2002 年から報告数が急増していることが見て取れる。Figure 1-8 A, B をそれぞれ比較すると、それらが描く曲線の形状が類似していることが明らかである。すなわち、ハイドロゲルの研究は再生医療分野に携わる研究者の高い需要から発展したと考えられる。また、ハイドロゲルの研究における深い構造的な理解と材料設計発展し、細胞培養に適した細胞適合性と力学特性を備えたハイドロゲルが開発されたということが、再生医療に関する研究を後押ししたとも考えられる。いずれにしても、ハイドロゲルと再生医療の領域に関する研究は相互作用をしながら成長してきたということが想像できる。1996 年から 2016 年までの 10 年間に於いて 2 年ごとにそれぞれの年で発行された tissue engineering に関する研究と、hydrogel を tissue engineering に応用する研究の報告件数をまとめると Figure 1-8 C のようなグラフが得られた。棒グラフの上を示した数字は、tissue engineering の研究報告件数に対する、hydrogel を tissue engineering に応用した研究の報告件数の割合を示している。このグラフから、1996 年においてはわずか 1.8%に過ぎなかった tissue engineering を hydrogel によってとりおこなう研究の割合は 2016 年には 12.8%にまで増加していることが分かる。さらに、Figure 1-8 D から分かるように、ハイドロゲルに関係した研究論文の全報告数に対して、tissue engineering を指向した研究は、2016 年において 15.8%にも上る。これは、1996 年と比べると 50 倍にまで増加していることが分かる。この論文ベースの研究発表件数に鑑みると、ハイドロゲルは特に再生医療に特化した研究が進みつつあり、さらに再生医療の発展は、ハイドロゲルが支えてきたということが垣間見える。このようにハイドロゲルは、薬学、医学を支える材料の一つとして今もなお活発に研究が進められている。

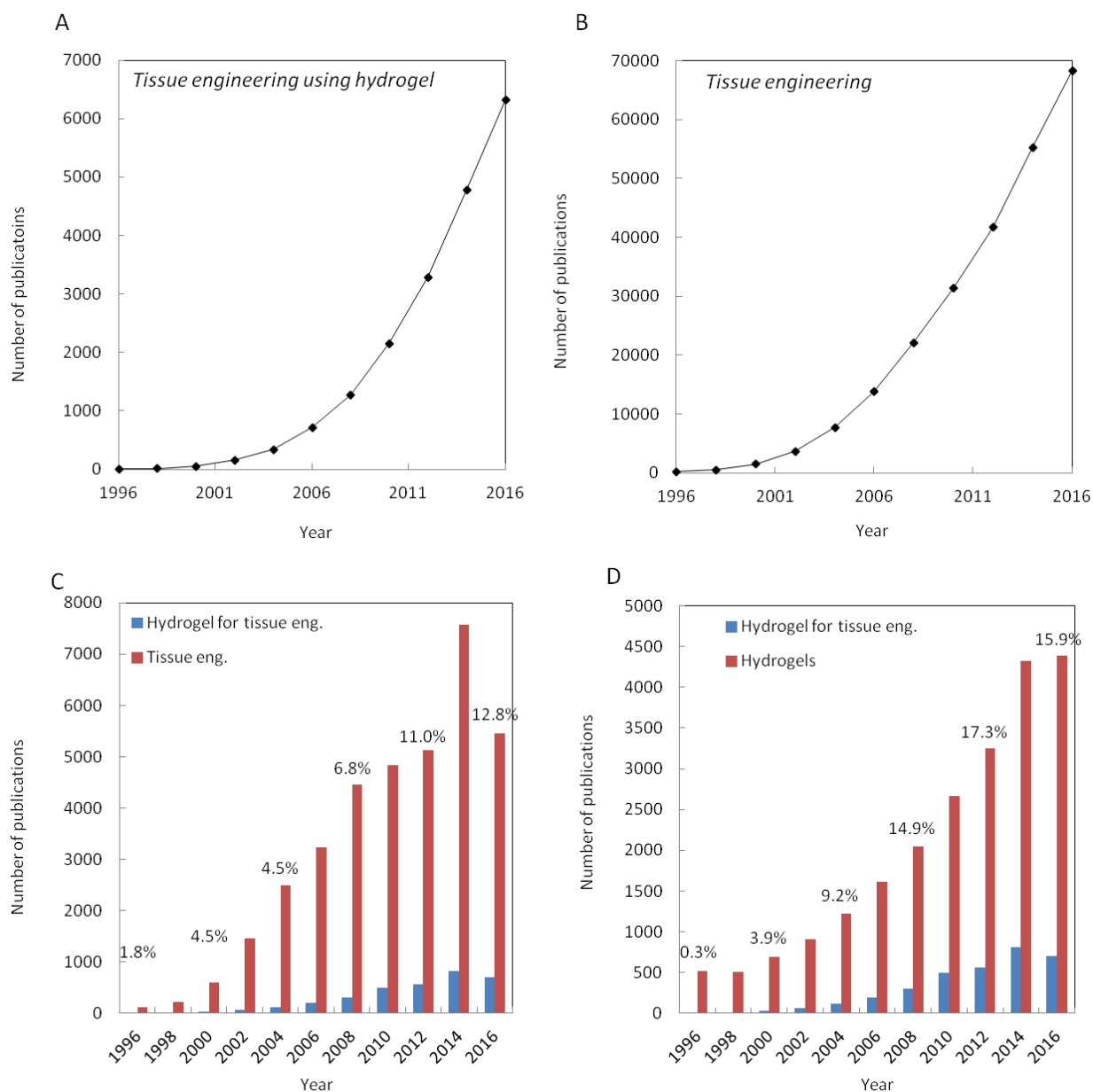


Figure 1-8. The number of publications in the last two decades with the key words of "tissue engineering & hydrogel"(A) and "tissue engineering"(B). The number of publications in each two years with the key words of "hydrogel & tissue engineering" and "tissue engineering"(C) and "hydrogel & tissue engineering" and "hydrogel"(D). The numerical character in the figures indicate ratio of publication number with the key words of "hydrogel & tissue engineering" to that of "tissue engineering" and "hydrogels"

### 1.3. ハイドロゲルの加工

1.2.3.において述べたように、ハイドロゲルは再生医療の分野に広く使用されている。ハイドロゲルを再生医療の足場材料としてより良く活用するためには、ゲルの機械強度やゲル表面における接着タンパク質の密度を適切に制御する必要があるとされている。そのため、ハイドロゲルの形状や機械強度を目的に合わせて自由自在に加工・成型する試みが、今まで多くの研究者らによってなされている。今までに、光リソグラフィー<sup>13, 31</sup>、マイクロ流路<sup>32</sup>、3Dプリンター<sup>33-39</sup>などのデバイス

を使用し、様々な形状を持つハイドロゲルが構築されてきている。

### 1.3.1. 光リソグラフィーによるゲルの微細加工

光リソグラフィーは紫外線をレンズによって集光させ、局所的に照射させることで、ナノメートルサイズの極めて微細な形状を構築することが可能である。そのため、半導体の集積回路を作製するための手法の第一段階において、レジスト膜を形成する操作に広く用いられている。半導体分野のみならず、この手法はハイドロゲルを微細加工するためにもしばしば用いられてきた。Figure 1-9 に示すように、光架橋性の高分子の水溶液に対して、レンズによって集光した紫外線を照射することで、極微細なハイドロゲルの加工が可能となっている<sup>35</sup>。例えば Hahn らは、光リソグラフィーを用いて、RGD の密度を階層的に変化させた PEGDA ゲルを作製し<sup>31</sup>、細胞の増殖と伸展方向の制御に成功している。そのほかにも、リソグラフィーを用いてハイドロゲルを微細加工し、細胞の分化、伸展方向の制御を行う研究が報告されている<sup>40</sup>。リソグラフィー装置を用いた手法によって、ハイドロゲルの微細加工は可能であるが、この作製プロセスは、一つの構造体を作るのに 1-2 カ月を要する<sup>38</sup>ことから、主にナノ、マイクロサイズのゲルの加工に有効であると考えられる。

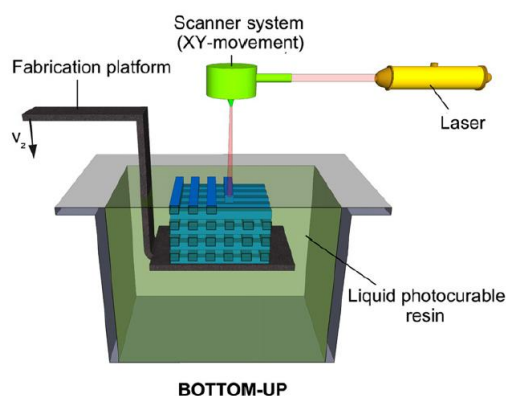


Figure 1-9 Scheme of a bottom-up stereolithography setup.<sup>35</sup>

### 1.3.2. マイクロ流路を用いたゲルの加工法

マイクロ流路も、ハイドロゲルの微細加工に対して有効な方法であり、硬さ、特定のたんぱく質などの濃度に勾配をつけたハイドロゲルを作製することに有用である。Burdick らは Figure 1-10 に示すマイクロ流路を用いて、RGD の濃度勾配を持たせたハイドロゲルを作製した。Figure 1-10 を見てわかるように(可視化のためにローダミン B 溶液が流れている)、蛍光強度に階層的な変化がみられる。この手法によって RGD の濃度を階層的に変化させたゲルを作製し、その濃度勾配によって、播種した細胞の密度の制御に成功している<sup>32</sup>。マイクロ流路に流れる前駆溶液のポリマー濃度に勾配を持たせることで、ハイドロゲルの力学強度にも同様の階層構造を導入することができると考えられる。そのため、二次元方向に対して力学的強度や接着タンパクの濃度に勾配を持たせたハイドロゲルの作製に対して有用な方法である。この手法も同様に流路のサイズが小さいため、微細なゲルの構築には有用であるが、作製対象となるゲルのサイズアップを図ることは難しい。

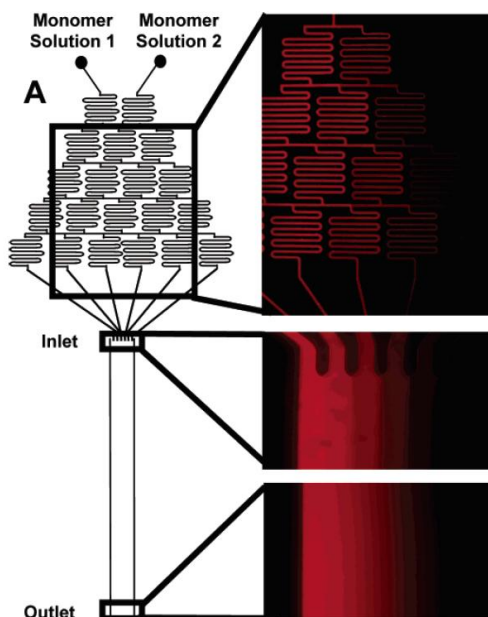


Figure 1-10. Schematic of the channel used in the microfluidic/photopolymerization process along with fluorescent images of the gradient maker and channel gradients at the inlet and outlet, where rhodamine is incorporated into monomer solution 1 and the monomer solutions are flowed.<sup>32</sup>

### 1.3.3. 粘稠水溶液のカクテル構造を用いた積層法

1.3.1, 1.3.2 において述べた方法はいずれも微細加工に適しているが、作製に時間がかかるため、サイズの大きなハイドロゲルの作製には向いていない。マクロサイズのハイドロゲルを任意の形状で作製し、なおかつ力学的強度に階層構造を持たせるためには、別の手法を開発する必要があった。Karpiak らはスクロースの濃厚溶液を、ハイドロゲル前駆体を作製する際の溶媒として用いることで、架橋前に積層させる手法を開発した<sup>41</sup>。この報告によると、PEGDA をスクロース溶液に溶解させ、PEGDA の濃度を 10, 15, 20% まで増加させた前駆溶液を作製したのち、前駆溶液をカクテル状に積層させ、紫外線を照射し、ゲルを架橋することで、力学的な強度を階層的に変化させたハイドロゲルの簡便な構築が可能である。それぞれの濃度を持つ前駆溶液によって作製されたゲルは、滑らかに接合されており、ゲルの界面において強度低下が起こらない。このようにハイドロゲルの前駆体を架橋前に積層させることによって、複数の組成から成るハイドロゲルを簡便に作製可能であり、比較的サイズの大きなゲルを短時間で作製することができる。

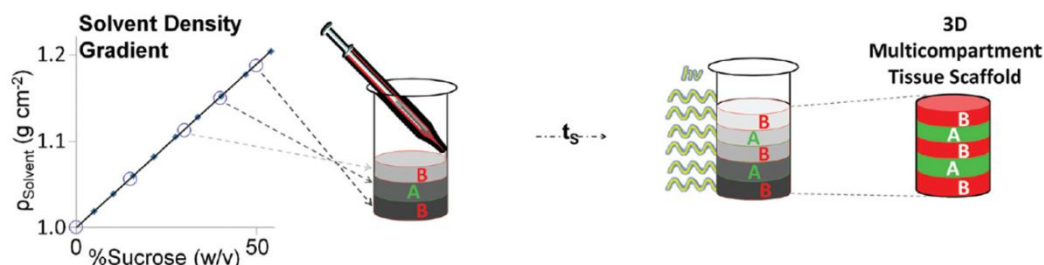


Figure 1-11. Schematic representation of the density gradient multilayer polymerization method. Five serially diluted solution of scurose are co-dissolved with prepolymer.<sup>41</sup>

### 1.3.4. 3D プリンターを用いたゲルの構築法

現在、3D プリンターは、CAD ファイルによって作成された設計図を基にして、複雑な立体構造を簡便に作製する手法の一つとして広く認識されるようになってきた<sup>38</sup>。1980 年代に Hull によって初めて開発された 3D プリンターは、ステレオリソグラフィの技術を用いて、前駆体を重合させることで、自由自在にプラスチックの製品を微細加工することができた。しかしながら、サイズによるものの、製品の完成にはおおむね 1-2 カ月を要することから、実用化には向いていないとされていた<sup>38</sup>。その後、粉末法<sup>42-43</sup>、シート積層法<sup>44</sup>、インクジェット法<sup>45</sup>などの様々な原理をもとに 3D プリンターが開発されてきた。3 章で詳述するが、近年では、古川らによってハイドロゲルを 3D プリンターによって作製できるようになっており、ハイドロゲルの任意の形状構築がますます盛んにおこなわれるようになってきている<sup>46</sup>。3D プリンターの開発は近年ますます発展が進んでおり、今後のハイドロゲル開発に対して、大変大きな期待が寄せられている。

このように、多くのデバイス開発に支えられ、ハイドロゲルの任意形状構築は活発に行われている。しかしながら、いまだに高価な装置を使用する例が多くみられるのも事実である。

## 1.4. 本論文の主題と構成

本論文では、産業や薬学など幅広く応用され、特に再生医療に対してきわめて大きな貢献が期待されるハイドロゲルを自由自在に加工成型することに主眼を置いている。ハイドロゲルは優れた物性を有するものの、加工が難しいため、微細加工や任意形状への加工が困難であるとされてきた。本研究では、自己修復ゲルを前駆体として用い、今まで作製が困難であった複雑な形状を有するハイドロゲルデバイスの開発方法(自己修復テンプレート法)の確立に成功した。その成果を以下にまとめる。

第二章では、SHT の母材となる自己修復ハイドロゲルの開発に成功した。4 arm PEG-phos と特定の金属イオンの間で起こる架橋により構築される自己修復ゲルの特性を示し、そのゲル化のメカニズムにも言及した。有機金属錯体を架橋点とした自己修復ゲル開発は現在も盛んにおこなわれている研究であり、この章で述べたゲル化メカニズムはこれら研究に対して、ゲル化が起こる金属と配位子の組み合わせの予測にも役立つと考えられる。

第三章では、自己修復テンプレート法によって複雑な形状を有する光架橋ゲルを作製することに成功した。SHT が有する優れた自己修復性により、テンプレート同士の界面は修復され、貫入している PEGDA は UV 照射によって二次的に架橋可能であった。これにより、自在にゲルの形状を構築したのちに UV 照射によって簡便に PEGDA ゲルのみを取り出すことに成功した。

第四章では、SHT に貫入させる高分子の種類を温度応答性を有するスマートポリマー(PNH)と PEGDA の二種類に増やし、それぞれの貼合わせ性能を観察した。結果として異種ポリマーを内包する SHT 間でも自己修復は起こり、界面での強固な貼合わせが確認された。これにより、今までは並行平板型が主であったアクチュエーターに対して新たな形状を付与することが可能となった。

第五章では、自己修復テンプレート法のさらなる生体適合性向上のために、ヒアルロン酸を主原料とするメタルフリーの自己修復ゲルの開発に成功した。ヒアルロン酸を主原料とした場合、力学強度の低下が観察されたが、3D プリンターとの組み合わせなど、さらなる展開が期待された。

今まで、自己修復性という材料自身の特性のみに焦点が当たっていた自己修復ゲルであるが、例えば 3D プリンターとの組み合わせといった使いみち次第で、今後のモノづくりを大きく刷新させる能力を秘めているということが明らかとなった。本論文を足掛かりとして、今後様々なゲル研究が発展することを期待する。

### 1.5. 参考文献

1. Flory, P. J., The Configuration of Real Polymer Chains. *The Journal of Chemical Physics* **1949**, *17* (3), 303-310.
2. Flory, P. J.; Rehner, J., Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks I. Rubberlike Elasticity. *The Journal of Chemical Physics* **1943**, *11* (11), 512-520.
3. Stockmayer, W. H., Theory of Molecular Size Distribution and Gel Formation in Branched Polymers II. General Cross Linking. *The Journal of Chemical Physics* **1944**, *12* (4), 125-131.
4. Tanaka, T.; Fillmore, D. J., Kinetics of swelling of gels. *The Journal of Chemical Physics* **1979**, *70* (3), 1214-1218.
5. Tanaka, T., Kinetics Of Phase Transition In Polymer Gels. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **1986**, *140*, 8.
6. Jian Ping Gong, Y. K., Takayuki Kurokawa, and Yoshihito Osada, Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength. *Advanced Materials* **2003**, *15*, 4.
7. Harada, A.; Kobayashi, R.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H., Macroscopic self-assembly through molecular recognition. *Nat Chem* **2011**, *3* (1), 34-7.
8. Sato, T.; Ebara, M.; Tanaka, S.; Asoh, T. A.; Kikuchi, A.; Aoyagi, T., Rapid self-healable poly(ethylene glycol) hydrogels formed by selective metal-phosphate interactions. *Phys Chem Chem Phys* **2013**, *15* (26), 10628-35.
9. Wang, Q.; Mynar, J. L.; Yoshida, M.; Lee, E.; Lee, M.; Okuro, K.; Kinbara, K.; Aida, T., High-water-content mouldable hydrogels by mixing clay and a dendritic molecular binder. *Nature* **2010**, *463* (7279), 339-43.
10. Lee, K. Y.; Mooney, D. J., Hydrogels for Tissue Engineering. *Chemical Reviews* **2001**, *101* (7), 12.
11. Spiller, K. L.; Maher, S. A.; Lowman, A. M., Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng Part B Rev* **2011**, *17* (4), 281-99.
12. Arakaki, K.; Kitamura, N.; Fujiki, H.; Kurokawa, T.; Iwamoto, M.; Ueno, M.; Kanaya, F.; Osada, Y.; Gong, J. P.; Yasuda, K., Artificial cartilage made from a novel double-network hydrogel: In vivo effects on the normal cartilage and ex vivo evaluation of the friction property. *J Biomed Mater Res A* **2010**, *93* (3), 1160-8.
13. Hahn, M. S.; Miller, J. S.; West, J. L., Three-dimensional biochemical and biomechanical patterning of hydrogels for guiding cell behavior. *Advanced Materials* **2006**, *18* (20), 2679-+.
14. Tanaka, M., Design Concept of Dialyzer Biomaterials: How to Find Biocompatible Polymers Based on the Biointerfacial Water Structure. *Contrib Nephrol* **2017**, *189*, 137-143.
15. Uhrich, K. E.; Cannizzaro, S. M.; Langer, R. S.; Shakesheff, K. M., Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chemical Reviews* **1999**, *99* (11), 3181-3198.
16. Van Tomme, S. R.; Storm, G.; Hennink, W. E., In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *Int J Pharm* **2008**, *355* (1-2), 1-18.
17. Jeong, B.; Bae, Y. H.; Lee, D. S.; Kim, S., Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems. *Nature* **1997**, *388*, 3.
18. Lee, D. S.; Shim, M. S.; Kim, S. W.; Lee, H.; Park, I.; Chang, T., Novel Thermoreversible Gelation of Biodegradable PLGA-block-PEO-block-PLGA Triblock Copolymers in Aqueous Solution. *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, *22*, 6.
19. Shim, M. S.; Lee, H. T.; Shim, W. S.; Park, I.; Lee, H.; Chang, T.; Kim, S. W.; Lee, D. S., Poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly (D,L-lactic acid-co-glycolic acid) triblock copolymer and thermoreversible phase transition in water. *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, *61*, 9.
20. Kimura, Y., Molecular, Structural, and Material Design of Bio-Based Polymers. *Polymer Journal* **2009**, *41* (10), 797-807.

21. Nagahama, K.; Fujiura, K.; Enami, S.; Ouchi, T.; Ohya, Y., Irreversible temperature-responsive formation of high-strength hydrogel from an enantiomeric mixture of starburst triblock copolymers consisting of 8-arm PEG and PLLA or PDLA. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, *46* (18), 6317-6332.
22. Nagahama, K.; Ouchi, T.; Ohya, Y., Temperature-Induced Hydrogels Through Self-Assembly of Cholesterol-Substituted Star PEG-b-PLLA Copolymers: An Injectable Scaffold for Tissue Engineering. *Advanced Functional Materials* **2008**, *18* (8), 1220-1231.
23. Akiyoshi, K.; Deguchi, S.; Moriguchi, N.; Yamaguchi, S.; Sunamoto, J., Self-Aggregates of Hydrophobized Polysaccharides in Water. Formation and Characteristics of Nanoparticles. *Macromolecules* **1993**, *26*, 7.
24. Lee, I.; Akiyoshi, K., Single molecular mechanics of a cholesterol-bearing pullulan nanogel at the hydrophobic interfaces. *Biomaterials* **2004**, *25* (15), 2911-8.
25. Sasaki, Y.; Akiyoshi, K., Nanogel engineering for new nanobiomaterials: from chaperoning engineering to biomedical applications. *Chem Rec* **2010**, *10* (6), 366-76.
26. Morimoto, N.; Qiu, X.-P.; Winnik, F. M.; Akiyoshi, K., Dual Stimuli-Responsive Nanogels by Self-Assembly of Polysaccharides Lightly Grafted with Thiol-Terminated Poly(N-isopropylacrylamide) Chains. *Macromolecules* **2008**, *41*, 3.
27. Osada, Y.; Okuzaki, H.; Hori, H., A polymer gel with electrically driven motility. *Nature* **1992**, *355*, 3.
28. Takashima, Y.; Hatanaka, S.; Otsubo, M.; Nakahata, M.; Kakuta, T.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Harada, A., Expansion-contraction of photoresponsive artificial muscle regulated by host-guest interactions. *Nat Commun* **2012**, *3*, 1270.
29. Gong, J. P., Why are double network hydrogels so tough? *Soft Matter* **2010**, *6* (12), 2583.
30. Langer R, V. J., Tissue engineering. *Science* **1993**, *260*, 11.
31. Hahn, M. S.; Miller, J. S.; West, J. L., Laser Scanning Lithography for Surface Micropatterning on Hydrogels. *Advanced Materials* **2005**, *17* (24), 2939-2942.
32. Burdick, J. A.; Khademhosseini, A.; Langer, R., Fabrication of Gradient Hydrogels Using a Microfluidics/Photopolymerization Process. *Langmuir* **2004**, *20* (13), 4.
33. Tsang, V. L.; Bhatia, S. N., Three-dimensional tissue fabrication. *Adv Drug Deliv Rev* **2004**, *56* (11), 1635-47.
34. Mironov, V.; Visconti, R. P.; Kasyanov, V.; Forgacs, G.; Drake, C. J.; Markwald, R. R., Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* **2009**, *30* (12), 2164-74.
35. Billiet, T.; Vandenhaute, M.; Schelfhout, J.; Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P., A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials* **2012**, *33* (26), 6020-41.
36. Duan, B.; Hockaday, L. A.; Kang, K. H.; Butcher, J. T., 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J Biomed Mater Res A* **2013**, *101* (5), 1255-64.
37. Mannoor, M. S.; Jiang, Z.; James, T.; Kong, Y. L.; Malatesta, K. A.; Soboyejo, W. O.; Verma, N.; Gracias, D. H.; McAlpine, M. C., 3D printed bionic ears. *Nano Lett* **2013**, *13* (6), 2634-9.
38. Gross, B. C.; Erkal, J. L.; Lockwood, S. Y.; Chen, C.; Spence, D. M., Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. *Anal Chem* **2014**, *86* (7), 3240-53.
39. Yanagawa, F.; Sugiura, S.; Kanamori, T., Hydrogel microfabrication technology toward three dimensional tissue engineering. *Regenerative Therapy* **2016**, *3*, 45-57.
40. DeForest, C. A.; Anseth, K. S., Cytocompatible click-based hydrogels with dynamically tunable properties through orthogonal photoconjugation and photocleavage reactions. *Nat Chem* **2011**, *3* (12), 925-31.
41. Karpiak, J. V.; Ner, Y.; Almutairi, A., Density gradient multilayer polymerization for creating complex tissue. *Adv Mater* **2012**, *24* (11), 1466-70.
42. Kumar, S., Selective Laser Sintering: A Qualitative and Objective Approach. *JOM* **2003**, *55* (10), 5.



43. J-P Kruth; P. Mercelis; Vaerenbergh, J. V., Binding mechanisms in selective laser sintering and selective laser melting. *Rapid Prototyping Journal* **2005**, *11* (1), 11.
44. M. Feygin; Shkolnik, A.; Diamond, M. N., Laminated object manufacturing system. *U.S. Patent* **1998**, 5,730,817.
45. Calvert, P., Inkjet Printing for Materials and Devices. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (10), 7.
46. Muroi, H.; Hidema, R.; Gong, J.; Furukawa, H., Development of Optical 3D Gel Printer for Fabricating Free-Form Soft & Wet Industrial Materials and Evaluation of Printed Double-Network Gels. *Journal of Solid Mechanics and Materials Engineering* **2013**, *7* (2), 6.

## 第 2 章

### リン酸基-金属イオンを架橋点とする自己修復ゲルの開発

## 2.1. 緒言

外部から受けた傷を自らの力で修復する自己修復材料は、材料工学の分野において建築物やインフラの長寿命化に大きく貢献する材料の一つとして近年注目を集める材料である<sup>1-3</sup>。確かに材料自身が傷を修復するシステムの構築はコスト面、安全面の双方から見てとても魅力的である。なぜならば完璧な自己修復材料が開発されれば構造物や製品の長寿命化と安全性向上に貢献するだけでなく、メンテナンス費用をも抑えることが出来るためである<sup>4</sup>。こうした自己修復材料の研究開発が活発である理由は我々が済む世界が直面する問題と密接にかかわっていると思われる。たとえば先進国の多くは1930年代から1960年代にかけて高度経済成長を受け、それと同時期に各地にインフラが敷設された。当時作られたインフラのほとんどが現在も継続して使用されているため<sup>5</sup>、老朽化したインフラには定期的なメンテナンスが欠かせない<sup>6-7</sup>。日本を例にとると、3.6兆円という莫大な費用がインフラのメンテナンスに対して支払われているという。これは日本の一般会計予算の3%にも上る金額である。日本では、2013年をメンテナンス元年と位置付け、インフラの機能と安全性の維持に対して莫大な予算とエネルギーを費やしている。こういった社会的背景も手伝い、100年も前に発明届出書が提出されている古参の自己修復材料がいまだ以て研究の最前線において脚光を浴びている。Figure 2-1 は自己修復材料に関する論文数の推移を示すグラフである。記録されている限りでは、1977年から報告がされており、毎年恒常的に自己修復材料の開発とそれに関する報告が学術誌によって報告されているということが分かる。グラフからは2004年以降から自己修復材料に関する報告が急速に増加する傾向が見て取れる。前述したように自己修復材料に対する社会的な需要が高まったという背景も手伝って、この分野の研究が急速に進んだことが推察される。また、自己修復材料の研究報告が急速な増加を示したのと同時期に、自己修復ゲルの研究が活発に報告されるようになってきている。自己修復ゲルの報告は1992年頃から報告が始まり、そのおよそ20年後の2012年を皮切りに報告数が急増している様子が確認された。自己修復ゲルは、近年になって、広く認識され、研究の対象となり始めたばかりであり、今後、この報告数が飛躍的に増加することが期待される注目の材料である。

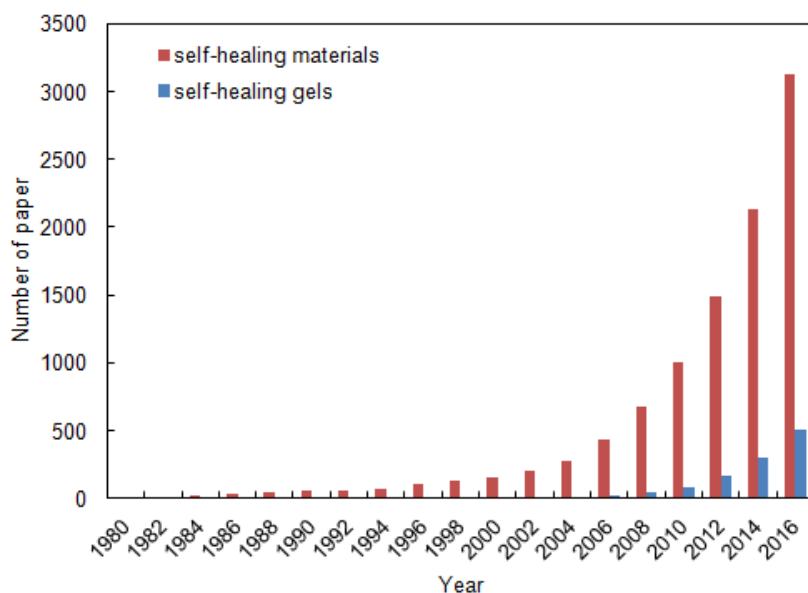


Figure 2-1. Transition chart of the number of publications with key word of "self-healing materials" and "self-healing gels" (source: SCOPUS).

自己修復材料の一般的な認識としては、構造材料や製品の部品を作製する際に用いることで、建築物や製品の安全率を上げ、製品寿命を延ばすことができる材料であると考えられている。そのため、今までに、産業への応用に特化した自己修復材料の開発が数多くなされてきている。しかしながら、昨今の自己修復材料はなにも産業や建設を活躍の場と限定していない。たとえばそれは医療や再生医療の分野にまで応用研究の場を広げており幅広く活躍が期待されている。京都大学の山中伸弥教授の iPS 細胞の発見を皮切りにさらに脚光を浴びる再生医療の現場では、目的に合わせて細胞培養基材を作る際に自己修復材料を用いることが検討されているし<sup>8,9</sup>、その優れたチキソ性を活用して注射針を通る薬物や細胞の担持体としての自己修復材料の応用も研究レベルではすでに開発が進められている状態である<sup>10</sup>。さらに自己修復材料の機能に注目した製品も次々に開発されており、例えばスマートホンの保護フィルムや、車の塗装などに実装されている例も報告されている。このように産業、医療など幅広く研究開発と商業化への試みが活発になされており、今後の社会への波及効果は大変に大きいと考えられる。

### 2.1.2. 自己修復材料の歴史

自己修復材料の構想は 100 年以上前に特許で発表された。当時の自己修復材料は、材料に傷や裂け目が入ったときに、自己修復剤がその傷を埋めるという発想であり、二成分以上により構成されていた<sup>11-12</sup>。例えば自己修復タイヤ、自己修復コンクリートは驚くべきことに 1900 年初頭からすでに考案されており<sup>13</sup>、現在でも技術の進歩を伴いながら実用化に向けて研究は続けられている<sup>14-15</sup>。さらに 2001 年に革新的な自己修復プラスチックが発明された<sup>16</sup>。これは、プラスチック母材の中にマイクロサイズのビーズと触媒を分散させた構造(Figure 2-1 A)となっている。マイクロサイズのビーズの中には、モノマーが内包されており、ひとたびプラスチック母材に亀裂が入ると、マイクロビーズ中のモノマーが亀裂に向かって流れだす。流れ出したモノマーは亀裂内で重合し亀裂を埋めることで自己修復を完結させる。同様の自己修復材料は数々報告されているが、修復機構を修復剤に頼っているためそれが枯渇すると自己修復がそれ以上起こらないという欠点が存在する。とりわけ同一箇所を繰り返し修復するということが苦手としている。この問題を克服するための試みとして、モノマーの内包体をビーズ状からキャピラリー状に変更し、血管のようにプラスチック母材に張り巡らせる方法が考案されている<sup>17-20</sup>。いずれにしても修復剤の枯渇を避けることはできないため、半永久的な自己修復は、この修復機構を用いる限り実現が非常に難しい。修復剤に頼る自己修復材料に対し、マトリックスそのものが動的な結合を有し、修復剤を用いずに自己修復する材料が活発に研究されるようになってきた。動的結合として注目されたのが Diels-Alder 反応である。この反応は共役ジエンとアルケンの反応により、六員環を作る反応であるが、興味深いことに、この反応は可逆的な平衡状態であるため、この反応によってポリマー同士を架橋した場合、動的に解離と再結合を行う架橋点を持つ材料を得ることが出来る<sup>21</sup>(Figure 2-1 B)。

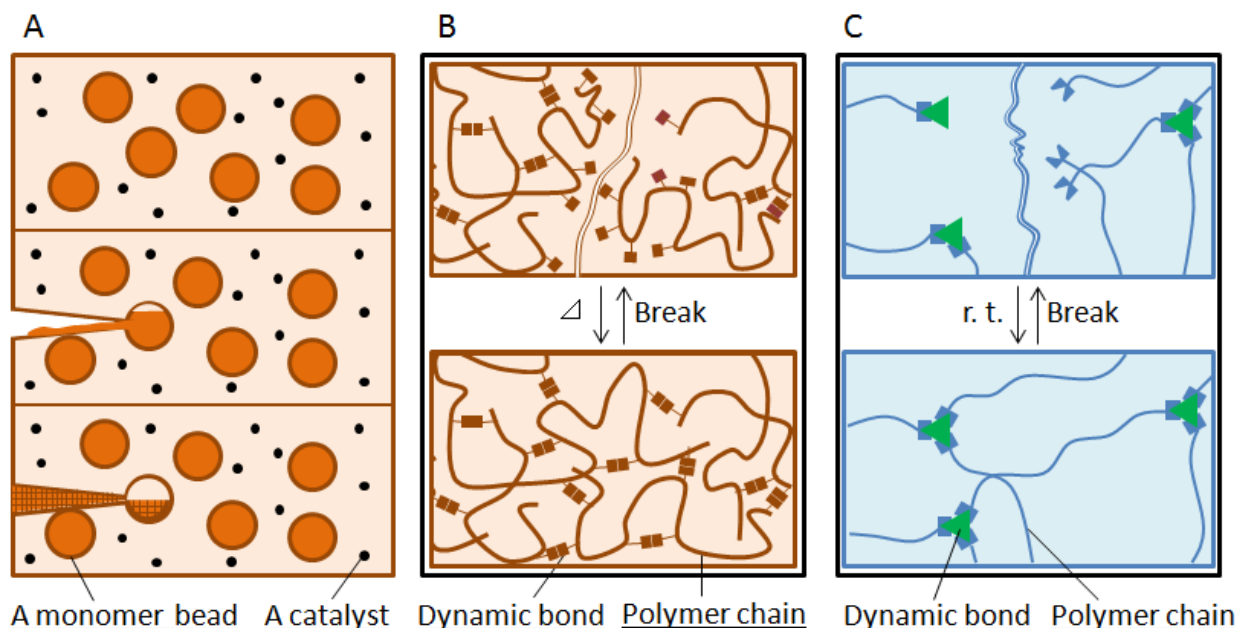


Figure 2-1. Typical self-healing pass ways on self-healing materials. (A) A self-healing event which is achieved by polymerization of an encapsulated healant monomer, limited by a healant depletion. (B) A self-healing plastic heal cracks repeatedly above the melting temperature of polymer. (C) A hydrogel which crosslinked by dynamic bond self-heal cracks regardless of the temperature.

例えば最初にこの反応を用いて作製されたポリスチレンを主原料とする自己修復材料に関する報告によると、材料の破断が主に架橋点において起こり、破断後に架橋点の再結合に伴う材料自体の自己修復が観察されている。このほかにも主鎖を $\epsilon$ カプロラクトンに変更した生分解性の自己修復材料なども報告されている。この動的結合を用いる自己修復機構は、架橋するポリマーの運動性を高く保つか、もしくは修復を行う際に上げる必要がある<sup>22-25</sup>。なぜならば架橋点の再結合のためには不対となった共役ジエンとアルケンを持つポリマーのダンダリング鎖同士が接触する必要があるためである。そのため、ポリマーの融点以上の温度域での使用が不可欠であり、使用可能温度域が制限されるということが課題である。ポリマーの運動性を融点以下で保証する方法は、良溶媒中にポリマーを保持するのが一番簡便な方法である。この条件を満たす最も一般的な構造はゲルである。自己修復ゲルは動的にポリマー鎖を架橋した三次元網目構造体の内部に大量の良溶媒を含んだ構造で、良溶媒が構造体中に存在する限り自己修復を繰り返し行うことが出来る<sup>26</sup>(Figure 2-1 C)。自己修復ゲルは非常に優れた修復の再現性を有し、さらに溶媒を水とする自己修復ハイドロゲルは優れた生体適合性を有するものも存在する。そのため、現在は医療や再生医療にこれらの自己修復ゲルを応用する研究が行われている。このように自己修復材料はその時代が求める需要とともに進化しており、開発初期においては産業を中心とした応用目的から、徐々に医療まで幅広く活躍の場を広げている注目の材料である。

## 2.2. 自己修復ハイドロゲルを構築する動的架橋メカニズム

前項で述べた自己修復材料の中でも、優れた修復性を有し、幅広い応用が期待される自己修復ゲルに関する研究は非常に活発に行われている。それら自己修復ゲルを構築するために用いられる動的な架橋様式は host-guest 相互作用、水素結合、有機金属配位結合、静電相互作用など数多くの報

告がされている。それらの中には生体内で起こる反応や生物が生存競争を勝ち抜く為に巧みに用いている化学反応などを模倣して動的架橋も存在し、非常にバラエティーに富んだ様式によって自己修復ゲルは構築されている。本項ではそれら洗練された架橋様式によって構築された自己修復ゲルとその物性に関して紹介していく。

### 2.2.1. Host guest 相互作用

シクロデキストリンは親水性の外郭と疎水性の空洞を持った環状糖分子である。シクロデキストリンの環は 6~8 分子の糖から構成されており、数によってそれぞれ  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  という種類に分類される。興味深いことに、シクロデキストリンはサイズおよび親疎水性特異的に空洞内にゲスト分子を取り込むことが出来る<sup>27</sup>。この現象を用いてペンダントのように高分子鎖にいくつものシクロデキストリンが貫入したポリロタキサンが合成された。この発見によって多くの機能化されたゲルの開発が進み、例えば伊藤らはスライドリングゲルという非常に伸縮性に富み、丈夫なゲルの開発に成功した。これは脆くて弱いという今までのゲルが持つイメージを大きく変える報告であるといっても過言ではない。また、高分子のみならず、特定の単分子とも可逆的なゲスト分子の取り込みが確認されており<sup>28</sup>、この平衡反応をホストゲスト相互作用と呼ぶ。原田らは  $\beta$  シクロデキストリンとアダマンタンなどのゲスト分子から成るホストゲスト相互作用をまるでナノサイズのスナップボタン(Snap button)のように利用し、任意に切断と再結合が可能な自己修復ゲルを開発した<sup>29-30</sup>。すなわち、それぞれ不対となったシクロデキストリンとアダマンタンを物理的に接近させることで、多点でホストゲスト相互作用を復活させ、自己修復させるという方法である。これは後述の自己修復機構と比べてはるかに迅速に自己修復が起こるといことが報告されている。加えてホストゲスト相互作用は、その反応の特異性から、夾雑物質が存在する条件においても問題なくゲルを構築する、もしくはゲルの自己修復が起こる。これは、例えば夾雑物質が多く存在する人体における応用を考えた場合に非常に有利な性質であると考えられる。さらに、host-guest 相互作用による修復機構は、競争ゲスト(competitive guest)という過剰量のゲスト分子を自己修復ゲルに添加することで、意図的にゲル自体の崩壊、もしくは自己修復の阻害を引き起こすこともできる。

### 2.2.2. 静電相互作用

高分子電解質に代表される電荷をもつ高分子は、それと対をなす荷電分子との引力によって相互作用を引き起こす。いわゆる静電相互作用と呼ばれる可逆的な結合は、主にポリマーナノコンポジットのゲルによくみられる結合様式である。ポリマーナノコンポジットの特長は、わずかな無機微粒子を高分子に添加することで飛躍的な力学的な強度上昇が見込まれるという点であり、古くはチャールズ・グッドイヤーが生ゴムの加硫架橋が有名である。相田らは、末端にグアニジウム基を有する三代 dendrimer と層状の水溶性鉱物(クレイナノシート)を混合し、自己修復ゲルを開発した<sup>31</sup>。驚くべきことに、組成の 95% が水という大量の水分を保持しているにもかかわらず、高い力学強度を有しているということが明らかとなった。また、切断面を 2~3 時間程度接触させておくと自己修復が起こるとい挙動も観察されている。架橋は dendrimer の末端のグアニジウム基が持つ正電荷と、クレイナノシートが持つ負電荷が静電的に引き合い、ラポナイトを中心とする多点で起こっている。この微視的な多点の相互作用が、最終的に巨視的なハイドロゲルの物性を上昇させることにつながっている。そのほかにも静電相互作用によって得られる自己修復ハイドロゲルの報告がなされており、イオン強度や pH によりゾルゲル転移を起こす自己修復ゲルの開発が期待されている。

### 2.2.3. 有機金属錯体を架橋点とした自己修復ゲル

生体に存在する酵素、DNA、タンパク質などは特定の成分の生成、代謝や貯蔵といった体内に欠

かせない生体活動をその分子自身が自発的にあるいは他分子から促進されて行う。これら生体活動に関与する巨大分子の多くは有機金属配位をもとに非常に秩序だった構造を構築し、機能発現に必要な超分子構造を形成している。この有機金属錯体も自己修復ゲルを構築する大変有用な駆動力となることが明らかとなっている。Waite らはムラサキイガイが出す足糸の構成成分から結合に寄与する構成成分から L-ドーパという成分を特定した。この L-ドーパは海中の  $\text{Fe}^{3+}$  に代表される金属イオンと有機金属錯体を形成することによって、吸着対象の物性に左右されず非常に強固な吸着を起こすことが明らかとなった。Andersen らはこの結合を模倣し、poly(ethylene glycol) (PEG) の末端に L-ドーパを導入し、 $\text{Fe}^{3+}$  と混合することで自己修復ゲルを開発した<sup>32</sup>。この研究では、ポリマー溶液と  $\text{Fe}^{3+}$  の混合溶液の pH によって相転移を起こし、例えば pH = 5 では水溶液、pH = 10 未満では粘性溶液、pH = 10 においてはゲル状態となることが報告されている。これは、PEG 末端に存在するカテコール基の脱プロトン化が pH 上昇に伴って起こり、結果として  $\text{Fe}^{3+}$  との相互作用が強くなるためであると考えられている。以上の例に限らず、そのほかにもターピリジン、クラウンエーテルなどの配位子と金属イオンの相互作用を架橋点にした自己修復ゲルが報告されている。

著者らはリン酸基の持つ優れた金属イオンとの配位に着目し、四分岐型 PEG の末端にリン酸基を導入した 4-arm PEG-phos と特定の金属イオンを添加して自己修復ゲルを開発した<sup>33</sup>。この自己修復ゲルは、カテコール基を末端に持つ PEG と  $\text{Fe}^{3+}$  の相互作用より成る自己修復ゲルと異なり、pH 条件を問わずゲル化が確認されている。第 2 章では、4-arm PEG-phos の水溶液と金属イオン水溶液との相互作用によって形成されるハイドロゲルの力学特性と自己修復性能について検討を行った。さらに 4-arm PEG-phos を架橋することが出来る金属イオンが有する条件を、クーロン力と配位子置換速度定数の観点から詳細に検討した。

## 2.3. 実験

### 2.3.1 本実験の概要

末端にリン酸基を有する 4-arm PEG-phos は、特定の金属イオン水溶液と混合することによって迅速に架橋され、速いもので 1 秒以内、遅くとも 40 秒程度の時間スケールでゲルを得ることが出来た。また、得られたゲルは自己修復能を有しており、切断した界面を単純に接触させておくだけで界面が切断前の強度まで回復していることが明らかとなった。この定性的な現象を動的粘弾性測定によって証明した。また、4-arm PEG-phos の架橋は、添加する金属イオン種に強く依存しており、確認した限りでは特定の金属イオン ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{V}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) に限定されていた。この現象を、クーロン力と配位子場上の水分子の交換反応から詳細に検討し、4-arm PEG-phos を架橋するために金属イオンが満たすべき条件を明かした。この証明によって、自己修復ゲルに添加すべき金属イオンを予測することが可能となり、また、出来上がった自己修復ゲルまたは 4-arm PEG-phos と金属イオンの混合水溶液を酸化還元により、また配位子交換速度定数の促進によって任意にゾルゲル転移を行うことを予測し、実際の実験検討によりそれを証明することができた。

### 2.3.2. 4-arm PEG-phos の合成

4-arm PEG-phos は、Figure 2-2 に示すような反応式にて、水酸基末端を有する四分岐 PEG (4-arm PEG) の末端をシュottenバウマン反応にて置換反応し、得た。具体的には PEG (4-arm PEG) を tetrahydrofuran (THF) に溶かし、1 g/50 mL の溶液を調整した。これと別に、4-arm PEG の末端に対して、50 モル当量の phosphoryl chloride を窒素雰囲気下にて THF で希釈した。氷冷下において窒素フローを行いながら、phosphoryl chloride/THF 溶液に対して PEG/THF 溶液を滴下した。滴下中は、マグネティックスターラーを用いて溶液を強撹拌をした。最後に phosphoryl chloride と等モル量の diisopropylamine を有機塩基として同様の方法にて加えた。反応溶液を室温に戻し、撹拌したまま窒

素雰囲気にて 20 時間反応させた。反応後、THF の半量の水を加えて反応を止め、残留する THF をロータリーエバポレーターで除去した。溶液を一度濾過し、分子量分画 3,500 のセルロース透析膜を用いて透析し、精製した。精製した溶液を凍結乾燥によって再度固体化させ、白色粉末状の 4-arm PEG-phos を得た。

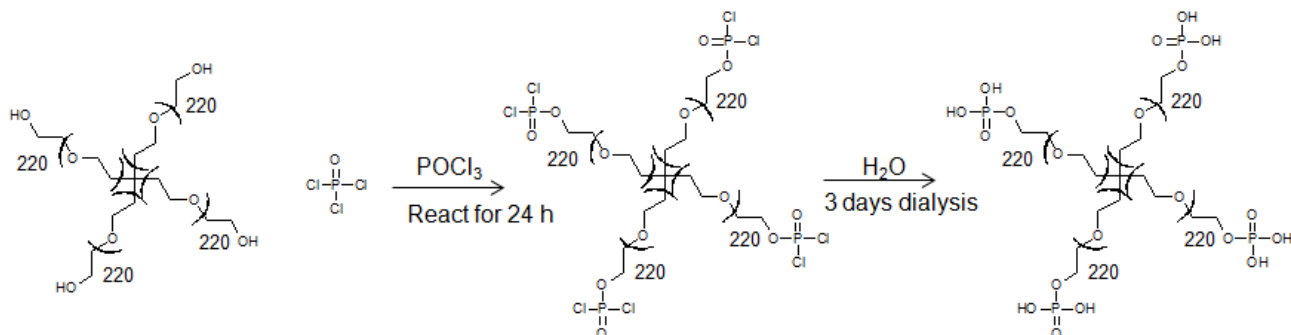


Figure 2-2. Synthetic scheme of 4-arm PEG-phos

### 2.3.3. 4-arm PEG-phos の導入率評価

合成した 4-arm PEG-phos を 30 mg 分取し、1 mL の  $\text{CDCl}_3$  に溶解させた。この溶液に対して基準物質として、tri-phenylphosphate を 3 mg 加え完全に溶解するまでボルテックスを用いて激しく攪拌した。調整したサンプルは、NMR (300 MHz)を用いて室温にて  $^1\text{H-NMR}$  と  $^{31}\text{P-NMR}$  の測定をおこなった。測定の条件としては、それぞれ積算回数を 16 と 1024 に設定した。

### 2.3.4. ハイドロゲルの作製

本章で扱うハイドロゲルの作製は、4-arm PEG-phos の水溶液に対して、4-arm PEG-phos の末端のリン酸基に対して 10 倍のモル濃度になるように金属塩化物水溶液を添加して作製した。混合の際は、マグネティックスターラーを用いて 4-arm PEG-phos の水溶液を攪拌させながら金属塩化物水溶液を静かに滴下した。この実験に関しては、すべての操作を大気下、室温条件にてとりおこなった。

### 2.3.5. 動的粘弾性測定を用いたハイドロゲルの力学測定

作製したハイドロゲルの力学強度は、動的粘弾性測定装置(Anthon Paar)を用いて測定した。測定ジグに直径 20 mm の並行平板プレートを使用し、剪断応力を振動モードによって印加した。ゲルに対して印加する周波数を 50Hz に固定し、与えるひずみを 1% から 50% に変化させ、1% のひずみ印加時にゲルの力学的強度を測定し、50% のひずみ印加時にはゲルを破壊した。ゲルに対して 1% のひずみを 150 秒間、50% のひずみを 30 秒間印加し、これを 2 周期繰り返した。

### 2.3.6. 4-arm PEG-phos を架橋する金属イオンが持つべき条件の予想

種々の金属イオン ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$ ,  $\text{V}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{Ru}^{3+}$ ,  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$  or  $\text{Gd}^{3+}$ ) 水溶液を 4-arm PEG-phos 水溶液に添加し、ゲル化挙動を観察した。それぞれの金属イオンは 4-arm PEG-phos の末端に対して、化学量論数にして 10 倍量添加し、添加後よく攪拌したのち 1 時間静置した。静置後、混合溶液の入ったサンプル瓶を傾け、溶液のゲル化を目視によって判断した。



## 2.4. 結果および考察

### 2.4.1. 合成した 4-arm PEG-phos の導入率評価

末端置換反応によって得られた 4-arm PEG-phos は、収率、導入率ともに高い値が示された。 $^{31}\text{H-NMR}$  の結果(Figure 2-3)より、10 ppm 近傍に 4-arm PEG-phos のリン酸エステル由来のピーク、-7.5 ppm 近傍には tri-phenylphosphate 由来のリン酸トリエステルのピークが検出された。それぞれのシグナルの積分値を算出し、NMR サンプルを仕込んだ際のそれぞれの物質質量比と照らし合わせて 4-arm PEG-phos の末端に存在するリン酸基の導入率を式(2-1)にしたがって算出した。

$$4 \cdot [4\text{-arm PEG-phos}]_{\alpha} : [\text{tri-phenylphosphate}] = \text{Int.}_{\text{monoether}} : \text{Int.}_{\text{triether}} \quad (2-1)$$

ここで、 $\alpha$  を導入率とし、積分値の比より 4-arm PEG-phos の末端に導入されているリン酸基の導入率を算出した。結果として、4-arm PEG-phos に導入されたリン酸基の導入率は 78% であるということが明らかとなり、少なくとも 4 鎖のうち 3 鎖にリン酸基が導入されていることがわかった。これにより、末端のリン酸基が金属イオンと相互作用することによって、それぞれのポリマー鎖同士が金属イオンを介して結合することによって架橋されるということが予想された。

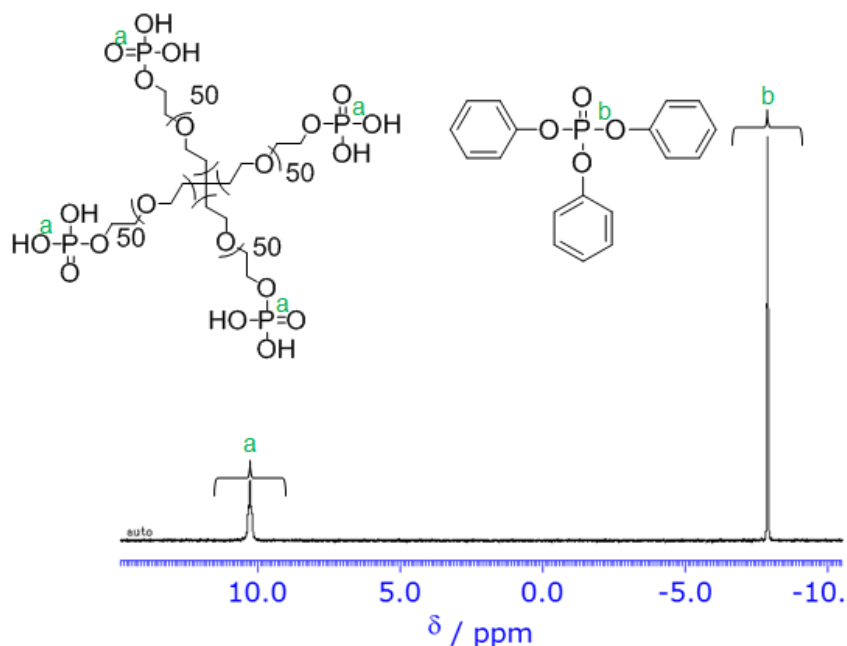


Figure 2-3.  $^{31}\text{P-NMR}$  spectra of 4-arm PEG-phos and tri-phenylphosphate

### 2.4.2. 4-arm PEG-phos と金属イオン水溶液の混合によるゲル化の確認

4-arm PEG-phos 水溶液と金属イオン( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$ ,  $\text{V}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{Ru}^{3+}$ ,  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$  or  $\text{Gd}^{3+}$ )水溶液の混合を行ったところ、 $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$ ,  $\text{V}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ との混合によってハイドロゲル様のサンプル形成が確認された(Figure 2-4)。それぞれの金属イオンとの相互作用は非常に迅速であり、イオン水溶液を添加後、数秒から 1 分以内ですべての架橋が完了するということが明らかとなった。また、架橋に要する時間は、イオン種によって異なっており、例えば  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}$ を添加した場合、迅速にゲル化が完了した(Figure 2-5)。一方で、 $\text{V}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ を添加後、架橋までにそれ以上の時間(30 秒から 45 秒)を要することを観察した(Figure 2-6)。金属イオンによって架橋をするものとならないものに分かれているという事実は非常に興味深く、その分類

が例えば金属イオンが持つ価数に依存しないという点も強調すべき点である。4-arm PEG-phos を架橋するイオンとしないイオンの詳しい分類に関しては、次項以降で議論するが、価数の高い金属イオンがすべからく 4-arm PEG-phos を架橋するとは限らないという事実が明らかとなった。

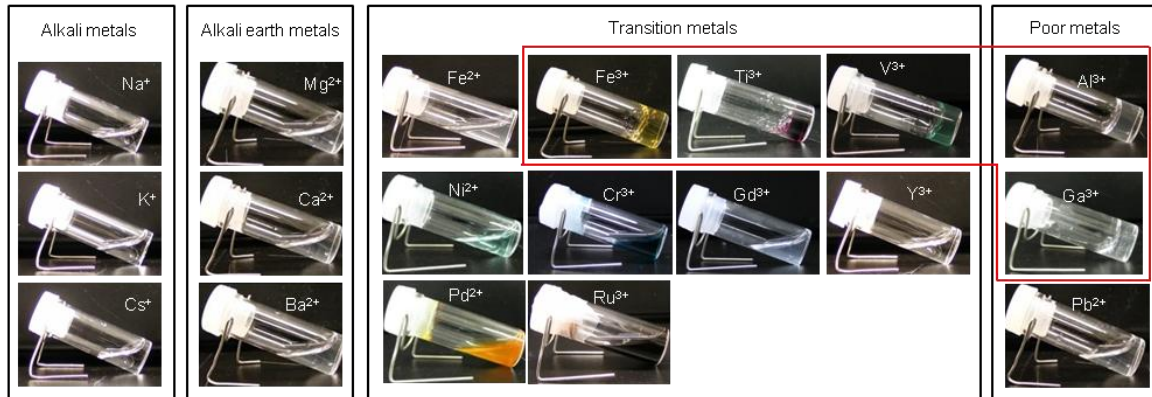


Figure 2-4. Photographs of 4-arm PEG-phos aqueous solutions in the presence of various metal ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}$ ,  $\text{V}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{Ru}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ , or  $\text{Pb}^{2+}$ ). The polymer solution (5 w/v%) was mixed with 1 M metal ions at room temperature (phos : metal = 1 : 10). The photographs were taken after a 24 h incubation at room temperature. The solutions were successfully gelled by trivalent metal ions such as  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{V}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}$ , and  $\text{Ga}^{3+}$  (highlighted area in red).

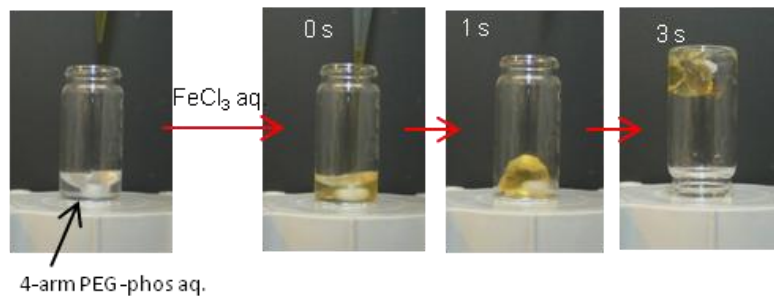


Figure 2-5. Photographs of process on crosslinking of 4-arm PEG-phos by adding of  $\text{FeCl}_3$  aq.

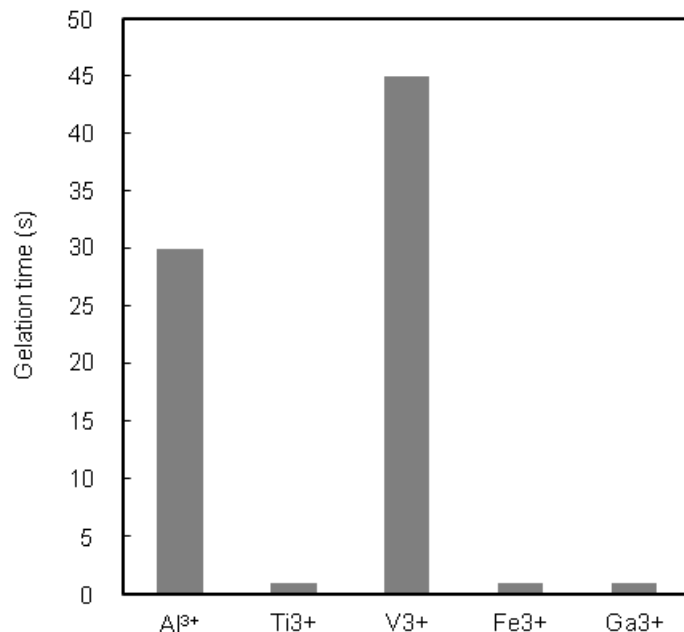


Figure 2-6. Evaluation of gelling time for crosslinking of 4-arm PEG-phos by AlCl<sub>3</sub>, TiCl<sub>3</sub>, VCl<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub> and GaCl<sub>3</sub> solutions.

#### 2.4.3. 金属イオンで架橋した 4-arm PEG-phos ゲルの自己修復特性の確認

4-arm PEG-phos 水溶液に対して Fe<sup>3+</sup> を添加して得られるハイドロゲルの自己修復特性を簡易的な手法で確認した。まず、ダンベル状の型を用意し、型の中で 4-arm PEG-phos 水溶液と FeCl<sub>3</sub> 水溶液を混合し、2 つのゲルサンプルを作製した。一方のゲルには自己修復挙動の可視化のために methylene blue を添加した。それぞれのダンベル型ゲルサンプルを長さ方向に対して垂直方向に半分に切断した。切断した界面を密着させ、5 分間静置した後、ゲルサンプルを長さ方向に引っ張ると、張り合わせた界面からの切断がみられず、傷を入れていない部分からの破断が観察された。この結果から、ハイドロゲルの界面が自己修復によって、力学的な強度が破断前の強度にまで回復したことが示された。本研究で開発したゲルの架橋メカニズムは、ポリマー末端のリン酸基と金属イオンの錯形成によると考えられる。そのため、一般的に、配位結合と共有結合の結合エネルギーを比べた場合、配位結合の結合エネルギーは共有結合のそれよりも小さい。そのため、ハイドロゲルのマクロスコピックな破断において、ゲルは架橋点から優先的な破壊が起こることが予想される。さらに、架橋点を構築する錯体は、解離と再結合を繰り返す平衡状態であるため、一つの架橋点を構築する金属イオンとリン酸基の錯体ユニットは、別のユニットの間で置き換わりが常に起きている。換言すれば、一度破壊された架橋点は、速やかに新たな架橋点を構築するということである (Figure 2-7)。以上の 2 つの理由から、ミクロスコピックなハイドロゲルの架橋点の破壊と再結合によって、マクロスコピックなハイドロゲルの自己修復という現象が起こったと推察される。また、近年 Gong らの研究グループにより報告されたハイドロゲルの自己修復挙動の詳細な検討によって、自己修復ハイドロゲルの架橋点となる動的結合の活性化エネルギーは、ゲルの切断界面とバルク中でそれぞれ異なることが明らかとなった<sup>34</sup>。具体的には、切断界面の架橋に要する活性化エネルギーの方が低いということがアレニウス式を用いた近似法によって明らかとなった。これは、切断された界面における架橋がより活発に起こることを示しており、自己修復に寄与する「界面における動的結合の再結合」がゲルの流動性に寄与する「バルク中での動的結合の置き換わり」よりも活発に起こるということを示している。この結果は、自己修復ゲルが比較的長時間初期形状を保つ一方

で、切断界面を単純な貼合わせによって速やかに修復するという一般的な自己修復ゲルの物性を支持する。

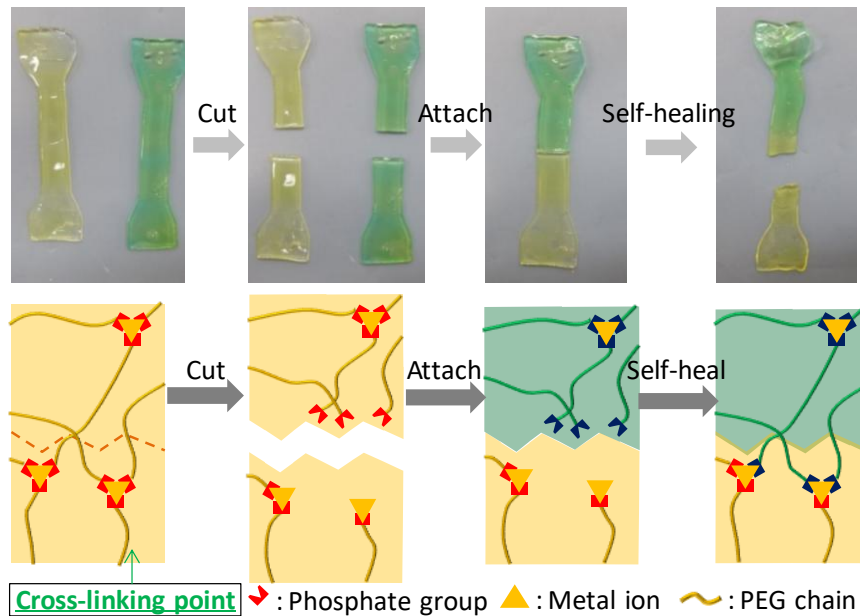


Figure 2-7. Self-healing behavior of the self-healing hydrogel based on 4-arm PEG-phos and a metal ion.

本研究によって開発した自己修復ゲルの修復挙動を目視によって観察した。しかしながら、実際に力学的な特性がどの程度回復しているのかを判断するにあたり、物性評価を詳しく検討する必要があった。ハイドロゲルの理学的な強度を測定するよく知られた手法として、動的粘弾性測定装置を用いた。多くの研究者たちによってなされている自己修復ゲルの修復特性の評価として、チキソ性の観察が一般的である。この方法の具体的な説明としては、ゲルの力学特性を評価する際にゲルに対して加える剪断応力を周期的に不連続に増減させ、高い印加応力においてハイドロゲルに対して破断を起こし、一時的なゲルの力学特性の低下を検出する。その後、ゲルに対して印加するせん断応力を緩和させ、ゲルの修復を観察する方法である。実際に 4-arm PEG-phos を各種金属イオンによって架橋したゲルを動的粘弾性測定したところ、Figure 2-8 に示すような挙動が観察された。印加するひずみを 1% から 50% に増大させた(図中、グレーのエリア)ところ、 $\text{Ga}^{3+}$  で架橋したゲルを除くすべてのハイドロゲルの力学挙動が低下し、貯蔵弾性率  $G'$  が損失弾性率  $G''$  を下回る挙動が確認された。これは、物性として、ゲル状態だった自己修復ゲルがゾル状態になったことを示す。よって、ゲルに対して大きな剪断応力を加えることによって、ゲルが破壊されたことが示唆された。

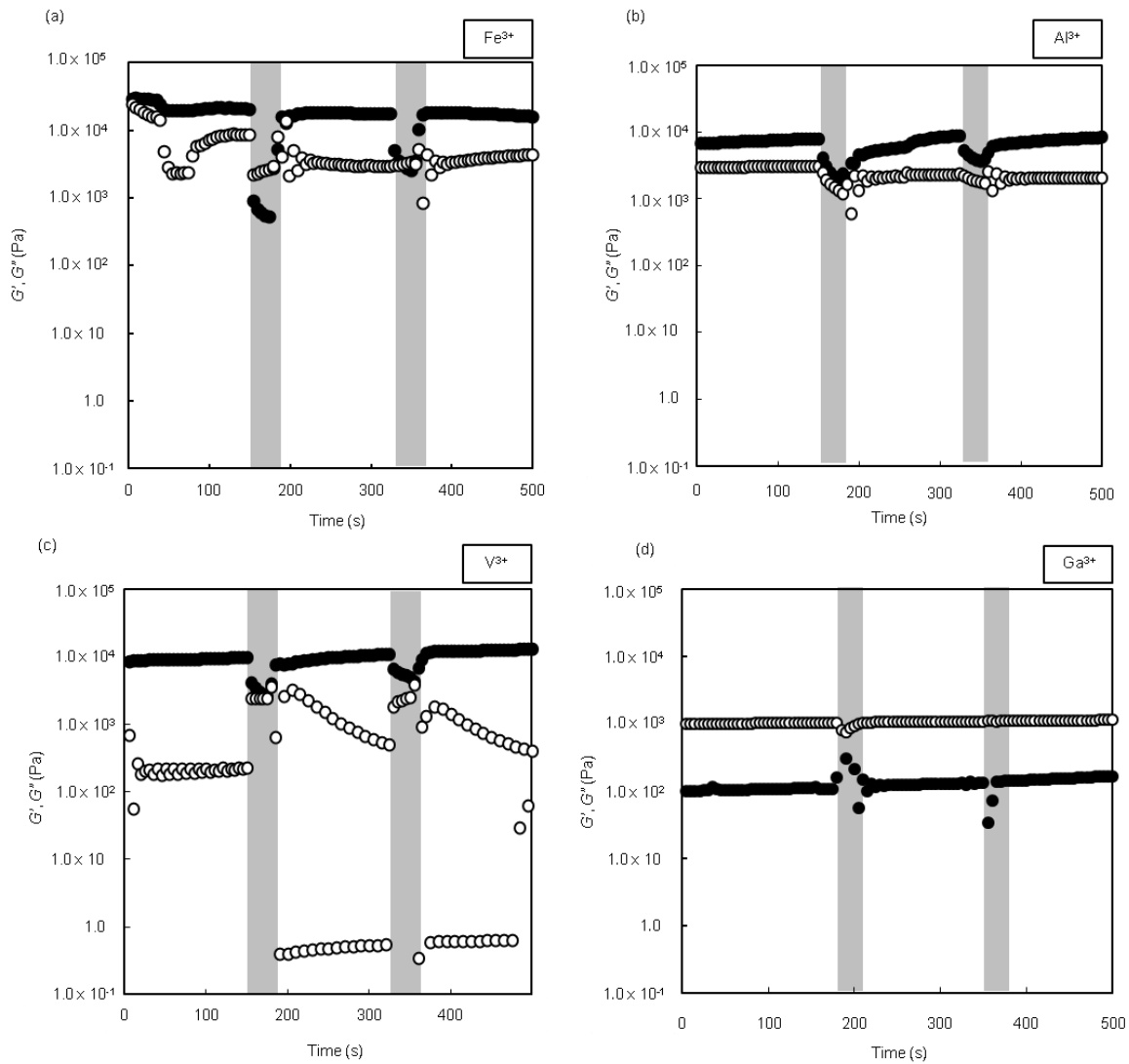


Figure 2-8. Rheological properties of hydrogels. G0 (closed) and G00 (open) values of 4-arm PEG-phos with (a)  $\text{Fe}^{3+}$ , (b)  $\text{Al}^{3+}$ , (c)  $\text{V}^{3+}$ , and (d)  $\text{Ga}^{3+}$  in continuous step strain measurements at a constant frequency of 0.5 Hz at room temperature. The gel was swept from a 1% (white areas) to 50% (gray areas) strain, and then back to 1% strain.

一方で、ひずみを1%まで緩和する(図中、白のエリア)とゲルの力学強度が破断前の状態まで戻ることが明らかとなった。測定の結果から、4-arm PEG-phos/metal ゲルは確かに自己修復するということが明らかとなった。しかしながら、4-arm PEG-phos/ $\text{Ga}^{3+}$ ゲルに関しては $G'$ が $G''$ を常に下回っており、物性としてはゾル状態であるということが明らかとなった。これは、4-arm PEG-phos/ $\text{Ga}^{3+}$ ゲルが持つ緩和時間が、他のイオンで架橋したゲルに比べて小さいということから生じていると考えられる。そこで、ゲルに印加する剪断応力の周波数を1 Hz から 10 Hz まで増大させたところ、4-arm PEG-phos/ $\text{Ga}^{3+}$ ゲルの物性はゲル状態を示す結果が得られた(Figure 2-9)。よって確かにゲルに対して印加する剪断応力の振動周期を速くすることによって、ゲルが示す応答挙動が変化することが明らかとなった。以上のように、ポリマーを変化させず、架橋に寄与する金属イオンを変化させることで物性が大きく変化するという興味深い結果が得られた。

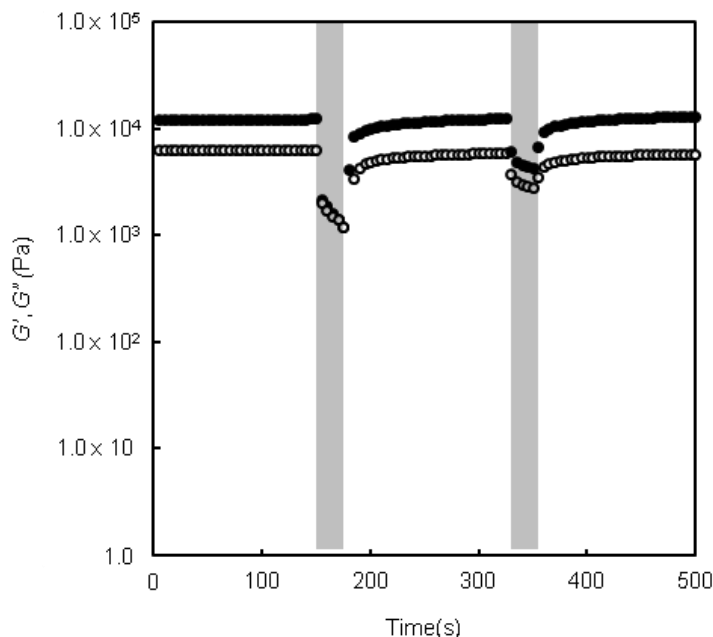


Figure 2-9. Rheological properties of hydrogels.  $G'$  (closed) and  $G''$  (open) values of 4-arm PEG-phos with  $\text{Ga}^{3+}$  in continuous step strain measurement at a constant frequency of 10 Hz at room temperature. Gel was swept from 1% to 50% strain, and then back to 1% strain.

#### 2.4.4. 4-arm PEG-phos の架橋に寄与する金属イオンが持つ条件

自己修復ゲルを構築する際に、2.5.2にて述べたように、架橋に寄与する金属イオンは $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$ ,  $\text{V}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ のみに限定されており、なおかつ 4-arm PEG-phos/metal ゲルは架橋する金属イオンによって大きく物性が異なるということが分かった。架橋の可否、ゲルの物性を支配する条件を解明するため、金属イオンが 4-arm PEG-phos を架橋する駆動力を考察した。駆動力として、1. クーロン力と 2. アクア錯体の配位子交換の 2つのパラメータが架橋に対して支配的であると仮定し、4-arm PEG-phos を架橋する金属イオンが有するべき条件を選定した。

##### 2.4.4.1 錯体形成に寄与するクーロン力の考察

クーロン力  $F$  は次の式(2)によって定義される。

$$F = k \cdot q_1 q_2 r^{-2} \quad (2)$$

ここで  $q_1$ ,  $q_2$  は接近した 2 種類の荷電粒子が持つ電荷を示し、 $r$  は 2 つの荷電粒子間の距離を示す (Figure 2-10)。ここで  $q_1$  に対しては 4-arm PEG-phos の末端に存在するリン酸基の電荷、 $q_2$  に対しては金属イオンの電荷、そして  $r$  をリン酸基と金属イオン間の距離と定義する。また、 $k$  は比例定数である。ここで、変数として定義した  $q_1$ ,  $q_2$ ,  $r$  の中で、 $q_1$  はすべての金属イオンに対して混合する 4-arm PEG-phos の pH 条件や濃度が同じである以上等しく定数として扱うことが出来る。同様に  $r$  に関して考えると、金属イオンの半径によって定められる変数である。今回は、添加した金属イオンのそれぞれを比較するための計算を行う。そのため結局、式(2)は単純化によって、リン酸基への見かけ上のクーロン力  $F'$  として式(3)という形に定義できる。

$$F' = q_2 \cdot r_i^{-2} \quad (3)$$

ここで、 $r_i$ は金属イオンの半径である。それぞれの金属イオン由来の $F'$ を求め、横軸をのイオン価数としてプロットしたところ、Figure 2-11のような結果を得た。4-arm PEG-phos を架橋した金属イオンは赤字表記、しなかったイオンは黒字表記している。結果として、 $F'$ の値が高い金属イオンが4-arm PEG-phos を架橋する傾向があることが明らかとなった。しかしながら、 $\text{Ru}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ は高い $F'$ を有するにも関わらず、4-arm PEG-phos を架橋することが出来ないということが明らかであり、この理論だけではゲル化のメカニズムを解明することは不可能であった。そのため著者は金属イオンの配位子交換速度に着目した。

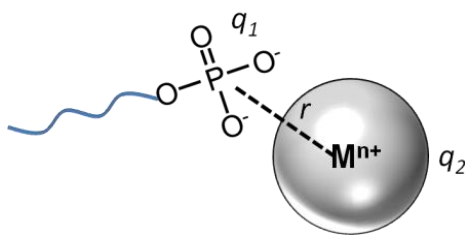


Figure 2-10. A schematic illustration how phosphate group interacts to metal ion via Coulomb's energy.

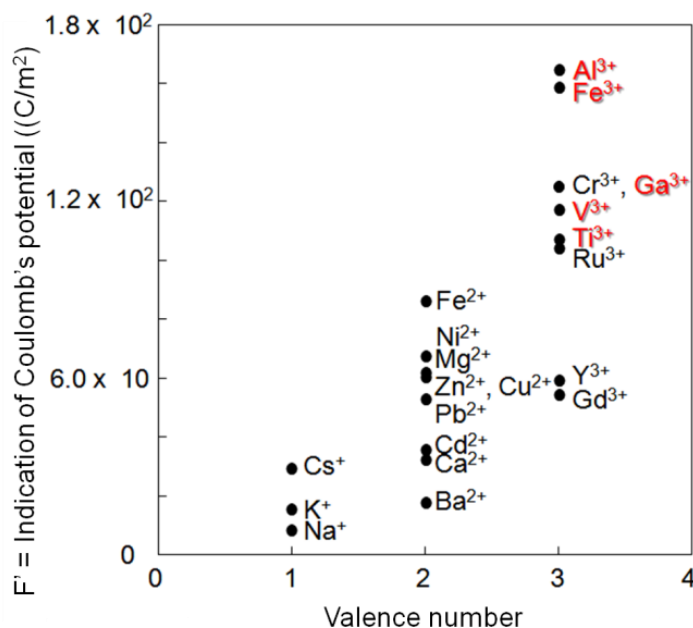


Figure 2-11.  $F'$  values of a variety of metal ions to phosphate group.

#### 2.4.4.2 配位子置換速度と架橋点の形成の関係

今回ゲルを形成するために 4-arm PEG-phos 水溶液と金属イオン水溶液を混合したが、一般的に金属イオンの配位子場上に水分子を配位させる。これをアクア錯体という。アクア錯体を形成する配位子場上の水分子は外界の水分子と絶えず置換をしており、この置換の速度を示す尺度を配位水置換速度としている。この速度は金属イオンに固有であり、活発に置換する置換活性のものと、ほとんど置換をしない置換不活性のものに分けられる。むろん金属イオン種によっては一瞬( $10^{-8}$ 秒以内)

で配位子場上の水分子を交換するものもあるが、逆に水分子の置換に  $10^4$  秒以上と大変長い時間を要するものも存在する。ここで、4-arm PEG-phos の架橋が金属イオンと末端のリン酸基の間に生じる配位であると考えた場合、置換不活性という性質は、架橋に不利に働くと考えられる。すなわち水分子が外れた非占有な配位子場の存在数が圧倒的に少なくなるため、リン酸基が配位できなくなるためである (Figure 2-12)。仮説としては、置換活性の金属イオンは 4-arm PEG-phos の末端のリン酸基とより配位しやすいと考えられる。ここで、水を配位子とした場合のそれぞれの金属イオンの置換速度を横軸に、縦軸に  $F'$  をそれぞれプロットしたところ Figure 2-13 のような結果を得た。この相図の桃色で囲まれた領域に存在する金属イオンは、4-arm PEG-phos を確かに架橋する金属イオンであった。仮説通り、配位子置換活性の金属イオンのみ 4-arm PEG-phos を架橋するということが明らかとなった。以上、2.4.4.1 および 2.4.4.2 それぞれの仮説から導き出された条件を用いて、4-arm PEG-phos の水溶液を架橋する金属イオンを予測することが出来るようになった。この予測をさらに応用すれば、例えば酸化還元によって水ゲルの可逆的なゾルゲル転移を起こすことができることが観察された。

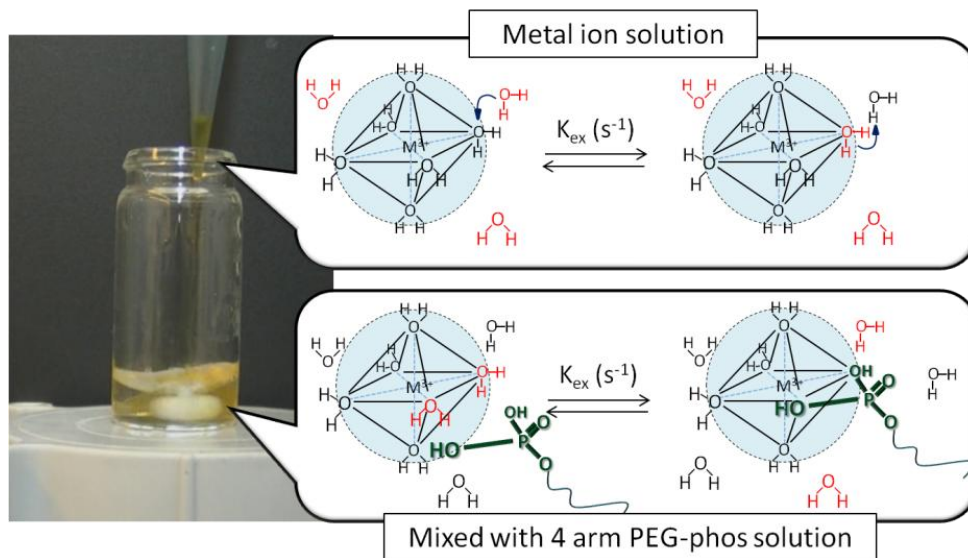


Figure 2-12. A schematic assumption of crosslinking of phosphate group and metal ion.



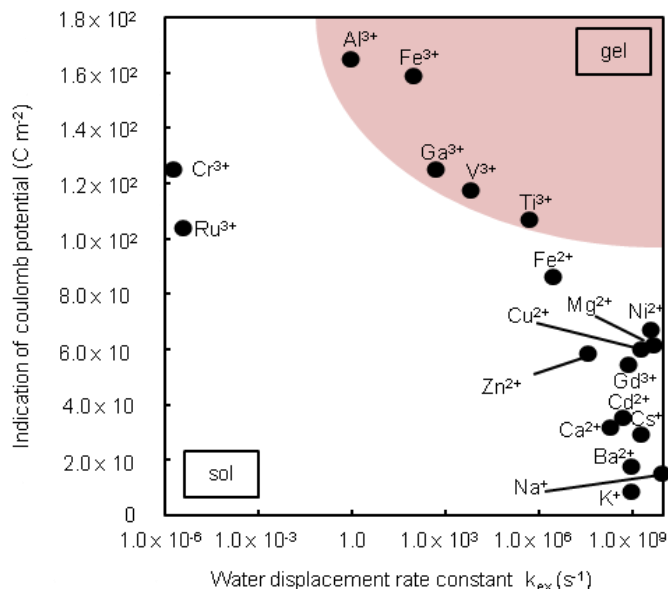


Figure 2-13. Relative Coulomb potential vs. characteristic rate constants for water substitution of metal ions. The trivalent metal ions which have a higher Coulomb potential value such as  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{V}^{3+}$ , and  $\text{Ti}^{3+}$  successfully crosslink phosphate-terminated PEG, while  $\text{Cr}^{3+}$  and  $\text{Ru}^{3+}$  do not due to the lower rate for water substitution.

#### 2.4.4.2 架橋に与る金属イオンの酸化還元によるゾルゲル転移挙動

前項で明らかとした架橋に与る金属イオンの条件を示す相図から、金属イオンの価数や配位置換速度定数などのパラメーターを変更することで、4-arm PEG-phos/金属イオン水溶液のゾルゲル転移を予想することが可能となった。検討として実施した実験としては、酸化還元によるハイドロゲルのゾルゲル転移挙動と、温度変化による配位子置換速度の促進によるゾルゲル応答である。イオンの酸化還元によるゾルゲル転移は、比較的酸化還元が起こりやすい金属イオンに限定されており、今回の検討では鉄イオンの酸化還元でのゾルゲル転移のみを証明した。実際に酸化還元を検討した際のゲルの状態を Figure 2-14 に示す。4-arm PEG-phos と  $\text{Fe}^{2+}$  を混合させた場合は、架橋は起こらずゾル状態であった。ここに酸化剤として  $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加したところ、 $\text{Fe}^{2+}$  の酸化に起因すると考えられる 4-arm PEG-phos の架橋が確認された。一方で、一度参加させた  $\text{Fe}^{3+}$  は、アスコルビン酸ナトリウム水溶液の添加によって容易に再度ゾル状態に戻すことができた。アスコルビン酸を加えた後のゾルは黒紫色に変色しており、添加したアスコルビン酸と  $\text{Fe}^{3+}$  の間でのキレート形成によって変色したものと考えられる。アスコルビン酸分子自体が競争配位子として働き、リン酸基/金属イオン間の架橋を破壊したということも考えられた。そのため、 $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{V}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}$  それぞれの金属で架橋したハイドロゲルに対してアスコルビン酸ナトリウム水溶液を加えたところ、4-arm PEG-phos/ $\text{Fe}^{3+}$  ゲルでのみゲルゾル転移が観察された。このことから、アスコルビン酸が競争的に金属イオンとキレートを作り、架橋点を崩壊させるよりも、金属イオンを還元することに対してより優位に働いているということが明らかとなった。さらに、加えたアスコルビン酸ナトリウムと等量のリン酸を加えたところ、すべてのゲルでゾルゲル転移が観察された。これは、アスコルビン酸とリン酸の配位能を比較した際に、リン酸の配位能がより強いということを示唆するデータであり、すなわちアスコルビン酸が確かに競争配位子ではなく、還元剤として作用し、4-arm PEG-phos/ $\text{Fe}^{3+}$  ゲルをゾルに転移させたということをサポートした。このように酸化剤、還元剤の添加という簡便な方

法にて可逆的なゾルゲル転移応答を可逆的に行うことができ、例えば紫外線や電流によって簡便に溶解するハイドロゲルの開発も期待される結果となった。

さらに、 $\text{Ru}^{3+}$ は三価金属イオンで、高い  $F'$ を示したにも関わらず 4-arm PEG-phos のゲル化に至らなかったが、温度を  $80^\circ\text{C}$  まで加温すれば、30 分で架橋させることができた(Figure 2-15)。これは、 $\text{Ru}^{3+}$ の配位子置換速度を温度上昇によって促進することによって得られた結果であると考えられる。以上の結果から、架橋可能な金属イオンが持つべき条件を網羅的に検討し、相図によってそれを予測するとともに、その後得られたハイドロゲルに対してどういった操作を行うとゾルゲル転移が可能であるのかという予測を立てることが出来るようになった。

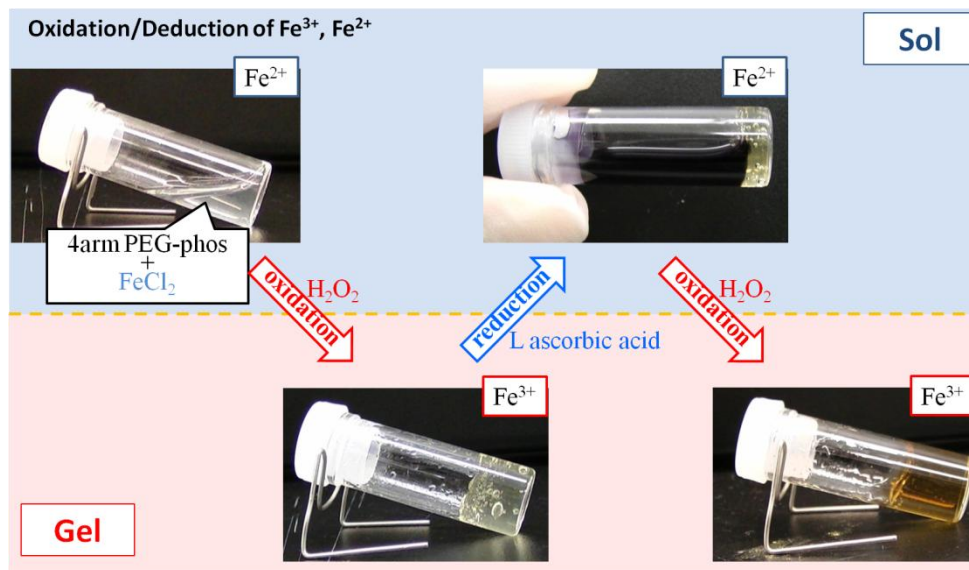


Figure 2-14. Redox-responsive reversible sol-gel transition of 4-arm PEG-phos solution upon adding  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.3%) as an oxidant and ascorbic acid (1 M) as a reductant.

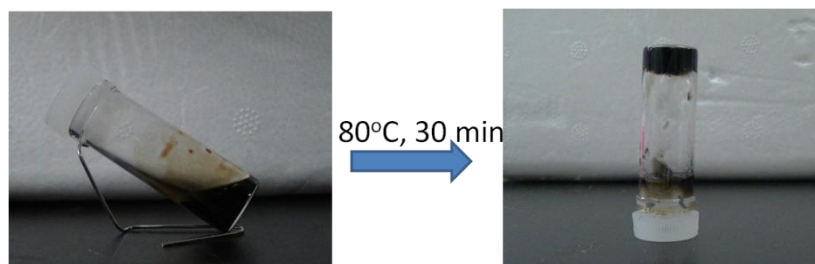


Figure 2-15. Heating-responsive sol-gel transition of 4-arm PEG-phos/ $\text{Ru}^{3+}$  solution.

## 2.5. 結言

第 2 章では、自己修復テンプレート法を確立するにあたって自己修復ゲルの開発と、開発したハイドロゲルが示す物性を明かとし、ゲルを合成するために架橋剤として働く金属イオンが持つ条件を検討した。

今回、自己修復ゲルの骨格となるポリマーとして、リン酸基を末端に有する四分岐型の poly(ethylene glycol) 4-arm PEG-phos を独自に合成し、 $^{31}\text{P}$ -NMR からポリマー末端に対して高い導入

率でリン酸基が導入できていることが分かった。導入率が 78%であるということから、実際には四分岐の中の少なくとも 3 鎖がリン酸化されていれはうまくゲル自己修復ゲルを形成することが出来るということが明らかとなった。

4-arm PEG-phos のリン酸基末端に 10 等量の  $\text{Fe}^{3+}$  イオンを添加して合成した自己修復ゲルの修復挙動を目視および動的粘弾性測定装置によって定性的、定量的に判断した。ゲルの自己修復は、接着剤などを用いずに、単純に切断界面を接触させておくだけで完了し、修復後の強度は破壊前のゲルの強度と同様であることが明らかとなった。動的粘弾性測定による詳細な検討により、破壊後の迅速な自己修復挙動が観察された。各種金属イオンで架橋した自己修復ゲルの力学的な特性は、金属イオンに依存しており、力学的強度、修復時間などが添加する金属イオン種によって異なることを観察した。

自己修復ゲルを合成する際に 4-arm PEG-phos を架橋することができる金属イオン種が満たすべき条件を、クーロン力と配位子置換速度の二つのパラメーターによって検討した。結果として明らかとなったことは、リン酸基との間で強いクーロン力を示し、また配位置換速度が速い(置換活性)金属イオンのみが 4-arm PEG-phos を架橋しているという事実であった。これによって、ゲルの架橋前後、4-arm PEG-phos/金属イオン混合物に対して、例えば金属イオンの酸化還元、もしくは加熱による配位子置換速度の促進を与えれば、ゾルゲル転移を起こすことが分かった。この検討において、あらかじめ自己修復ゲルを合成するために添加するべき金属イオンの予測をすることができると同時に、ゲルに対してどのような操作を加えれば、ゲルの物性、ゾル状態、ゲル状態に変化を与えることができるのかを知ることが可能となった。

今回の検討を通して、自己修復テンプレート法を実施するにあたり不可欠となる自己修復ゲルのマトリックスを合成することができた。また、4-arm PEG-phos のみならず、その他の官能基を持つポリマーの金属架橋をも予測し得る結果が得られた。今回の知見が、単純な自己修復ゲルの合成と評価という基礎的な材料開発報告にとどまらず、錯体を架橋点とする自己修復ゲルの開発に役立てられることを期待する。

## 2.7 参考文献

1. Zwaag, S. v. d., Self-Healing Materials. *Springer Series in Materials Science* **2007**, *100*, 391.
2. Syrett, J. A.; Becer, C. R.; Haddleton, D. M., Self-healing and self-mendable polymers. *Polym. Chem.* **2010**, *1* (7), 978-987.
3. Diesendruck, C. E.; Sottos, N. R.; Moore, J. S.; White, S. R., Biomimetic Self-Healing. *Angew Chem Int Ed Engl* **2015**, *54* (36), 10428-47.
4. Breugel, K. v., Is There A Market For Self-Healing Cement-Based Materials? *Proceedings of the First International Conference on Self Healing Materials* **2007**, 9.
5. Qureshi, N.; Shan, J., Aging infrastructure and decreasing demand: A dilemma for water utilities. *Journal AWWA* **2014**, *106* (1), 11.
6. Penny Burns, D. H., Jeff Roorda, Managing infrastructure for the next generation. *Automation in Construction* **1999**, 8 15.
7. Wu, M.; Johannesson, B.; Geiker, M., A review: Self-healing in cementitious materials and engineered cementitious composite as a self-healing material. *Construction and Building Materials* **2012**, *28* (1), 571-583.
8. Wei, Z.; Yang, J. H.; Zhou, J.; Xu, F.; Zrinyi, M.; Dussault, P. H.; Osada, Y.; Chen, Y. M., Self-healing gels based on constitutional dynamic chemistry and their potential applications. *Chem Soc Rev* **2014**, *43* (23), 8114-31.
9. Wu, Y.; Wang, L.; Zhao, X.; Hou, S.; Guo, B.; Ma, P. X., Self-healing supramolecular bioelastomers with shape memory property as a multifunctional platform for biomedical applications via modular assembly. *Biomaterials* **2016**, *104*, 18-31.
10. Rao, Z.; Inoue, M.; Matsuda, M.; Taguchi, T., Quick self-healing and thermo-reversible liposome gel. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2011**, *82* (1), 196-202.
11. Wool, R. P., Self-healing materials: a review. *Soft Matter* **2008**, *4* (3), 400.
12. Van Tittelboom, K.; De Belie, N., Self-Healing in Cementitious Materials—A Review. *Materials* **2013**, *6* (6), 2182-2217.
13. Chinnock, G. H., SELF-HEALING MATERIAL. *USPatent* **1902**, *707*, 550, August 26, 1902.
14. Yang, Y.; Urban, M. W., Self-healing polymeric materials. *Chem Soc Rev* **2013**, *42* (17), 7446-67.
15. Nagaya, K.; Ikai, S.; Chiba, M.; Chao, X. J., Tire with self-repairing mechanism. *Jsm Int J C-Mech Sy* **2006**, *49* (2), 379-384.
16. White, S. R.; Sottos, N. R.; Geubelle, P. H.; Moore, J. S.; Kessler, M. R.; Sriram, S. R.; Brown, E. N.; Viswanathan, S., Autonomic healing of polymer composites. *Nature* **2001**, *409* (6822), 794-797.
17. Blaiszik, B. J.; Caruso, M. M.; McIlroy, D. A.; Moore, J. S.; White, S. R.; Sottos, N. R., Microcapsules filled with reactive solutions for self-healing materials. *Polymer* **2009**, *50* (4), 990-997.
18. Yuan, Y. C.; Rong, M. Z.; Zhang, M. Q.; Chen, J.; Yang, G. C.; Li, X. M., Self-Healing Polymeric Materials Using Epoxy/Mercaptan as the Healant. *Macromolecules* **2008**, *41*, 6.
19. Yang, J.; Keller, M. W.; Moore, J. S.; White, S. R.; Sottos, N. R., Microencapsulation of Isocyanates for Self-Healing Polymers. *Macromolecules* **2008**, *41*, 6.
20. Caruso, M. M.; Blaiszik, B. J.; White, S. R.; Sottos, N. R.; Moore, J. S., Full recovery of fracture toughness using a nontoxic solvent-based self-healing system. *Adv Funct Mater* **2008**, *18* (13), 1898-1904.
21. Stevens, M. P.; Jenkins, A. D., Crosslinking of Polystyrene via Pendant Maleimide Groups. *Journal of Polymer Science* **1979**, *17*, 11.
22. Chen, X.; Wudl, F.; Mal, A. K.; Shen, H.; Nutt, S. R., New Thermally Remendable Highly Cross-Linked Polymeric Materials. *Macromolecules* **2003**, *36*, 6.
23. Chen, X.; Dam, M. A.; Ono, K.; Mal, A.; Shen, H.; Nutt, S. R.; Sheran, K.; Wudl, F., A Thermally

Re-mendable Cross-Linked Polymeric Material. *Science* **2002**, 295, 6.

24. Y.-L. Liu; Hsieh, C.-Y., Crosslinked Epoxy Materials Exhibiting Thermal Remendability and Removability from Multifunctional Maleimide and Furan Compounds. *J Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2005**, 44, 9.
25. Zhang, J.; Niu, Y.; Huang, C.; Xiao, L.; Chen, Z.; Yang, K.; Wang, Y., Self-healable and recyclable triple-shape PPDO-PTMEG co-network constructed through thermoreversible Diels-Alder reaction. *Polym. Chem.* **2012**, 3 (6), 1390.
26. Appel, E. A.; del Barrio, J.; Loh, X. J.; Scherman, O. A., Supramolecular polymeric hydrogels. *Chem Soc Rev* **2012**, 41 (18), 6195-214.
27. Harrison, I. T.; Harrison, S., The Synthesis of a Stable Complex of a Macrocyclic and a Threaded Chain. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89 (22), 2.
28. Appel, E. A.; Loh, X. J.; Jones, S. T.; Biedermann, F.; Dreiss, C. A.; Scherman, O. A., Ultrahigh-water-content supramolecular hydrogels exhibiting multistimuli responsiveness. *J Am Chem Soc* **2012**, 134 (28), 11767-73.
29. Miyamae, K.; Nakahata, M.; Takashima, Y.; Harada, A., Self-Healing, Expansion-Contraction, and Shape-Memory Properties of a Preorganized Supramolecular Hydrogel through Host-Guest Interactions. *Angew Chem Int Ed Engl* **2015**, 54 (31), 8984-7.
30. Nakahata, M.; Takashima, Y.; Harada, A., Highly Flexible, Tough, and Self-Healing Supramolecular Polymeric Materials Using Host-Guest Interaction. *Macromol Rapid Commun* **2015**.
31. Wang, Q.; Mynar, J. L.; Yoshida, M.; Lee, E.; Lee, M.; Okuro, K.; Kinbara, K.; Aida, T., High-water-content mouldable hydrogels by mixing clay and a dendritic molecular binder. *Nature* **2010**, 463 (7279), 339-43.
32. Holten-Andersen, N.; Harrington, M. J.; Birkedal, H.; Lee, B. P.; Messersmith, P. B.; Lee, K. Y.; Waite, J. H., pH-induced metal-ligand cross-links inspired by mussel yield self-healing polymer networks with near-covalent elastic moduli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, 108 (7), 2651-5.
33. Sato, T.; Ebara, M.; Tanaka, S.; Asoh, T. A.; Kikuchi, A.; Aoyagi, T., Rapid self-healable poly(ethylene glycol) hydrogels formed by selective metal-phosphate interactions. *Phys Chem Chem Phys* **2013**, 15 (26), 10628-35.
34. Ihsan, A. B.; Sun, T. L.; Kurokawa, T.; Karobi, S. N.; Nakajima, T.; Nonoyama, T.; Roy, C. K.; Luo, F.; Gong, J. P., Self-Healing Behaviors of Tough Polyampholyte Hydrogels. *Macromolecules* **2016**, 49 (11), 4245-4252.

## 第3章

### 自己修復テンプレート法の開発

### 3.1. 緒言

本論文の最終的な目標は、ハイドロゲルを自由自在に加工成型し、任意の組成を持つゲルの組合せをも可能にするということである。後述するが、ハイドロゲルの加工成型、機能化には様々な方法がすでに検討されているが、いずれの方法においても一長一短あり、ゲルの加工成型の方法はまだまだ改善の余地が残されている。換言すれば、いまだにハイドロゲルの任意形状加工、任意組成の組合せによるゲルの成型は乗り越えるべき問題が残されているということである。著者は論文において自己修復ゲルを前駆体として、ゲルを作る方法論を開発した。自己修復テンプレート法と名付けられたこの方法で、今まで作製が困難であった形状のハイドロゲルを比較的簡便に作製できるようになった。

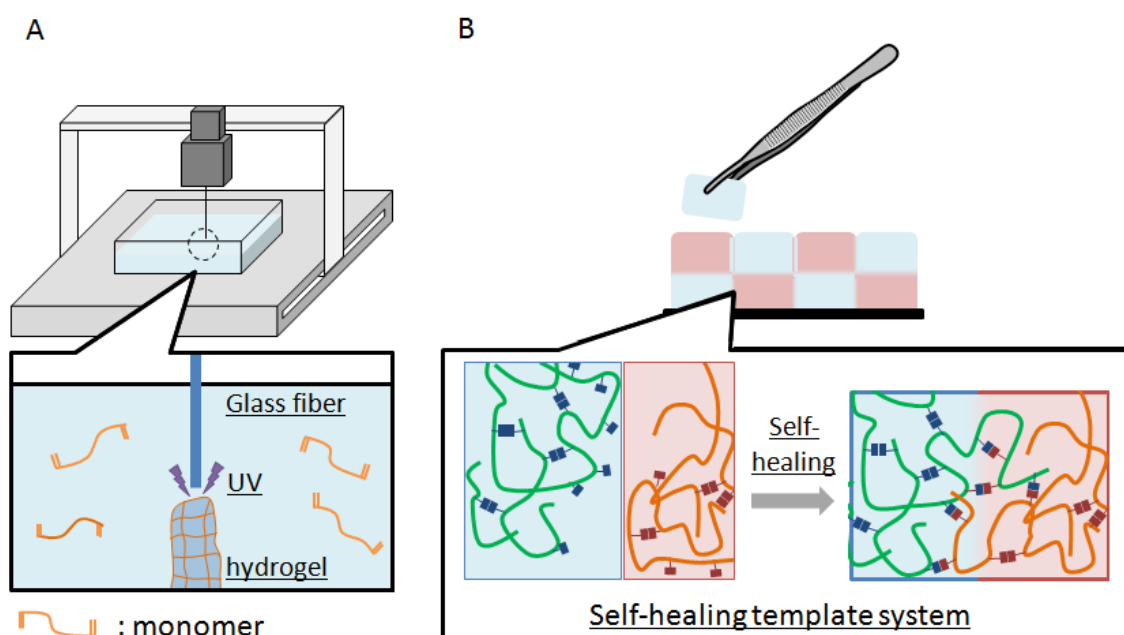


Figure 3-1. Two methods for preparing arbitrarily shaped hydrogels. A 3D hydrogel printing method (A) and a self-healing template method (B).

前章までで述べたように、ハイドロゲルは優れた生体親和性を有し、生体材料としての活躍が期待される材料である。しかしながら、加工、成型性の向上はかねてからの解決すべき課題であった。一般的なハイドロゲルの物性は柔らかくて脆い。そのためハイドロゲルを架橋したのち、微細な加工を施すことは困難である<sup>1</sup>。また、型に流し込んでゲルを作製する手法では、中空状、複組成による作製は事実上不可能である。以上のように、高い生体適合性に代表される優れた物性を持っているにもかかわらず、材料としての実用を考えた場合、ハイドロゲルはその加工性の乏しさは大きな欠点となる。事実、ハイドロゲルを主原料とする医療機器はコンタクトレンズなどのシンプルなものに限定されている。ハイドロゲルの自由形状、任意組成による作製は、今後のハイドロゲルデバイスの応用の幅を飛躍的に高めることが期待される。

任意形状でのハイドロゲル作製は古川らが行っている3Dプリンターを用いた任意形状ゲルの作製法が有名である(Figure 3-1 A)。古川らはバスタブ型3Dプリンターを用いて光架橋ポリマーゲルを微細加工する手法を編み出した<sup>2</sup>。これはバスタブ中にゲル前駆体水溶液を満たし、光ファイバーを用いて局所的にUVを照射することによって、溶液中にゲルを描画していくという方法で

ある。これを用いて自由形状のゲルの作製に成功している。一方で、この手法を用いた場合は組成を任意に、局所的に変えることが困難であり、自由形状かつ任意組成を一つのハイドロゲルに組み込むことは大変難しい。根本的な問題はゲルの前駆体が水溶液であるという点に起因する。水溶液を用いた場合、前駆体が流れてしまうため、形状を決定するために必ず型が必要になる。また、局所的にゲルの組成を変えるためには、その目的の部分に新しい前駆溶液を固定し架橋する必要があるため、ゲルの任意形状加工は大変難しいとされている。裏を返せば、前駆体を液体から固体に変えることで、上述のゲルの加工における問題をまとめて解決することが出来ると考えられる。著者らは、第2章で開発した自己修復ゲルの優れた界面融合性に着目し、これをハイドロゲルの前駆体として利用することを考えた。そこで四分岐型の PEG を金属イオンで架橋した自己修復ハイドロゲルのネットワーク中に光架橋高分子を内包させた"自己修復テンプレート"を独自に開発した<sup>3,4</sup> (Figure 3-1 B)。自己修復ゲルは形状を維持しつつ、界面を融合させる。積層したのち、形状を維持しつつ、界面の強度を上げることができる。この自己修復テンプレート法によってさまざまなハイドロゲルの形状構築を検討した。本章では、ハイドロゲルの任意形状構築によって得られる様々な利点と、その試みに対しての従来法のアプローチと自己修復テンプレート法の違いについて述べ、実際に作製されたゲルの物性評価を詳細に述べる。

### 3.2 ハイドロゲルの機能化

前節にて、ハイドロゲルを医療に応用するために、ハイドロゲルを加工することが不可欠であるということと、そのためのアプローチとして自己修復ゲルを用いることを述べた。本研究で開発した自己修復テンプレート法がどういう点で優れているのか、どういったシーンで使用されるべきかをよりの確に説明するため、ハイドロゲルの加工と機能化に対する従来より用いられてきた方法を述べていく。

#### 3.2.1 ミクロスコピックなゲルの機能化

ハイドロゲルの機能化の方法としては主に以下の2種類の方法に大別される。一つ目はゲルのネットワークを構成するポリマーもしくは架橋点を機能化する方法<sup>5,6</sup>であり、二つ目はゲルそのものの形状、局所的な架橋度や組成を変更する方法である<sup>7</sup>。前者の方法は、ミクロスコピックなゲルの機能化として位置付けることができ、外部環境から与えられる刺激に応答する高分子、いわゆるスマートポリマーと呼ばれる高分子材料がその一翼を担ってきた。さらに架橋点を機能化することで、紫外線や可視光線に応用してゾルゲル転移を示したり、自己修復性を付与することができる。そのため、今まで高分子研究者によって、自己修復ゲルを含む多くの高機能ゲルが開発されてきた。

##### 3.2.1.1 ゲルのネットワークの骨格となるポリマーの機能化

前述した通り、ハイドロゲルのネットワークの骨格となる高分子を機能化することで、ハイドロゲルはポリマー自体が有する機能を発現することが知られている。代表的な例として、poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)は、加減臨界溶液温度; LCST を有する温度応答性高分子であり、分子量によるが一般的に 32°C を境に高温側では疎水性、低温側では親水性となる鋭敏な相転移挙動を示すことが知られている。ハイドロゲルの骨格に PNIPAAm を導入した場合、そのハイドロゲルも同様の相転移挙動を示す<sup>8</sup>。PNIPAAm ゲルは今までに多くのハイドロゲルデバイスに応用されてきた。例えば、薬剤を担持させた NIPAAm ゲルは、32°C 以上の生体温度において最外層にスキン層という疎水性の薄膜が形成されることで、ゲルの内外での物質のやり取りが阻害される<sup>9</sup>。これによって薬物の徐放が抑制され、一方で 32°C 以下においては形成されていたスキン層が消失し、内包された薬剤が拡散則に従って放出される。一方でゲルの架橋密度減少させるか、comb type



の PNIPAAm をネットワークに導入することで、相転移温度以上においてハイドロゲルの鋭敏な収縮が可能となった<sup>10</sup>。この方法で作製したハイドロゲルの場合では、温度上昇によって、内包している薬物をゲルの内部の水と一緒に系外に放出することができ、先ほどの例とは逆に LSCT 以上で薬物を放出することが可能である。また、poly(acrylic acid) (pAAc) や荏原らが開発した poly(2-carboxyisopropylacrylamide) は、側鎖のカルボン酸が pKa を境にプロトン化、脱プロトン化を起こし、可逆的な疎水性・親水性相転移を示す。これらをゲルのネットワークに導入したハイドロゲルは pH に応答して膨潤、収縮を示すことが報告されている<sup>11</sup>。この例においても、pH という外部環境変化に応答して薬物放出を任意に操作できる薬物徐放担体としての応用が期待されている。

### 3.2.1.2 ゲルの架橋点の機能化

ゲルの架橋点を機能化することによるメリットは、特定の刺激によってハイドロゲルの体積を大きく変化させることができる点である。ある研究例では架橋点を外部の刺激によって増大させてゲルを収縮させ、また別の研究では外部刺激によって架橋点を減少、場合によってはすべての架橋点を外すことでゲルからゾルに転移させることも可能であるという報告がなされている。外部刺激として例えば、架橋点の競争分子<sup>12</sup>や、紫外線<sup>13</sup>などが一般的に使用されている。例えば Peng らは pAAc 側鎖のカルボン酸と Fe<sup>3+</sup>の錯体を架橋点とするハイドロゲルを開発した<sup>14</sup>。このゲルの架橋点の中心となる Fe<sup>3+</sup>は紫外線照射によって容易に還元される。Fe<sup>2+</sup>はカルボン酸との配位能が低く、架橋点を構築することができない。そのため、紫外線照射後はゾル状態となるが、酸素との接触によってふたたび Fe<sup>2+</sup>が酸化されるため、大気中に保持しておくことでゾルゲル転移を示すことが明らかとなっている。具体的な応用は言及されていないものの、紫外線に応答する機能化ゲルの研究例としては興味深い好例である。特定の物質やシグナルに対して鋭敏な応答をするこれらのハイドロゲルは、例えば疾病のシグナルとなる特定のたんぱく質に応答するセンサーとしての応用が期待されている。宮田らは分子インプリント法を用いて、ハイドロゲルのネットワーク中にあらかじめ IgG 抗体と特異的に結合できるサイトを形成した。このハイドロゲルデバイスは IgG 抗体をネットワーク中に取り込むと、IgG を介して新たに架橋点を形成する。よって IgG に応答して収縮するため、病気のシグナルに応答するセンサーとしての応用が期待されている<sup>15</sup>。また、作製のプロセスで、インプリントする抗原を変更すれば、その他のバイオマーカーに対して応答するセンサーを開発することも可能であると考えられている。さらに、ゲルに内包された薬剤の放出は、ゲル自身が崩壊しない限りネットワークの網目を介して透過することによって起こる。すなわち、架橋密度の疎密によって薬物放出の速度を加減できる。また、フェニルボロン酸とジオール化合物の反応も有名な物理架橋点である。例えばアクリルアミドの側鎖にフェニルボロン酸を導入したポリマーと poly(vinyl alcohol) (PVA) を混合することで、フェニルボロン酸とジオール間で起こる相互作用を物理架橋点を形成することが知られている。ここに競争分子としてグルコースなどの糖分子を添加と、糖分子とフェニルボロン酸との間でより強い相互作用が起これ、結果として物理架橋点が解離する。したがって、高い糖濃度の溶液にさらされると、内部の薬剤を放出する。この原理を応用して、ハイドロゲルにあらかじめインスリンを内包させておき、食後、糖濃度が高くなった場合にゲルからインスリンが放出されるようなインスリン担体、およびインスリンポンプの開発がなされている<sup>16-17</sup>。3.2.1.1 および 3.2.2.2 で紹介した研究例の場合でも、特定のシグナルや分子に応答してゲル自身がそれに対して応答するという非常に優れた特性を有しており、スマートな材料としての応用がますます期待されている<sup>18</sup>。

### 3.2.2 マクロスコピックなゲルの機能化

ハイドロゲルの形状と組成の組合せを工夫することで、ハイドロゲルに機能を付与させることができる。ハイドロゲルは作製プロセスを簡便にするという目的から並行平板のシンプルな形状が多い。例えば先述した刺激応答性高分子を用いてハイドロゲルを構築した場合、形状によって応答性が変化するということが明らかとなっている。例えば PNIPAAm を母材としてハイドロゲル微粒子を作製した場合、ゲル材料の比表面積が増大し、結果として非常に鋭敏な温度応答を示すことが知られている。これは温度応答に伴うゲルの脱水がゲルと外界の溶液の界面によってのみ起こるためであり、換言すればゲルのバルク部分に関しては、ゲルの脱水に直接寄与しないということを示す。そのため温度応答を鋭敏にするための戦略としては、ゲルの全体に占める比表面積を増大させる方法がとられている。Kim らは側鎖にベンゾフェノンを有する PNIPAAm を電子紡績によって射出し、直径が数百ナノメートルオーダーのファイバーメッシュを得た。紫外線架橋を施した PNIPAAm ハイドロゲルメッシュは、32°C を境に非常に鋭敏な温度応答を示し、バルクハイドロゲルでは実現できないほどの膨潤収縮挙動が報告されている。また、ゲルのネットワークのみならず、ファイバー同士の絡み合いの空隙からも物質が放出されるということが証明されており、細胞など比較的サイズの大きなものを温度によって能動的に放出できることが報告されている<sup>19</sup>。このようにゲルの形状を変えることで担持している薬剤や細胞の放出を巧みにコントロールできるということが報告されている。

ゲルを構築するポリマーの種類や架橋度を局所的に変えることでも、ハイドロゲルに機能を付与することができる。二層の並行平板ハイドロゲルで、一方の成分を温度応答性高分子で構成したハイドロゲルは、温度変化に応答して屈曲を起こすようになる<sup>7</sup>。原理としては、温度応答性高分子ゲルが加温されることで収縮し、そこに膨潤ミスマッチが発生する。結果として二層のゲル間で内部応力が発生して屈曲に至る。特別な刺激応答性高分子を用いなくても、架橋密度に疎密を加えることでゲルに膨潤と収縮を与えれば屈曲を再現することができる。例えば、単一のポリマーを用いてゲルを作製する際にも、ポリマーの分子量を変化させることで、ゲルに屈曲を与えることができる。このようなゲルデバイスは、ソフトアクチュエーターやソフトマニピュレーターとして応用が可能である。

2章でも述べたように、架橋点を機能化させることで、ハイドロゲルに対して自己修復特性を加えることもできるが、この自己修復ゲルも医療応用対して有用であるということが報告されている。次節 3.3.において、自己修復ゲルの医療に対する応用例を紹介する。

### 3.3. 自己修復ゲルの直接的な医用応用例

自己修復ゲルの多くは、一般的な化学架橋ゲル、物理架橋ゲルと同様に、組成の 90%以上が水で構成されており、中には優れた生体親和性が証明されている例も報告されている。このハイドロゲル特有の生体適合性を損なうことなく、自己修復に与する架橋点由来の毒性を最小限に抑えるための工夫が多く研究者によってなされてきた。例えば、シッフ塩基に代表される動的な性質を持つ動的な共有結合<sup>20</sup>、疎水性相互作用<sup>21</sup>、水素結合<sup>22</sup>などを代表とする非共有結合性の相互作用は、有機金属錯体のように金属イオンを用いる必要がないため、非常に高い生体親和性を発揮することが期待される。一方でこれらの相互作用が有する結合エネルギーは、ホストゲスト相互作用や有機金属錯体のそれらと比べると小さい。そのためこれらの相互作用によって構成される自己修復ゲルの力学的な強度は低くなりがちである。そのため、各架橋点において多点による結合を実現するために、研究者たちによって巧みな分子設計がなされてきた。例えば、水素結合によって構築される自己修復ゲルを例にとると、Cui らは DNA を構成する塩基対から着想を得、架橋点に多点的に水素結合を再現した<sup>22</sup>。その結果、水素結合という非常に弱い相互作用を用いても自己修復ゲルを構

築できることを証明した。複数に及ぶ生体応用の例が報告されているが、大きく分けると 1.インジェクタブルゲルとしての応用(Figure 3 A, B)<sup>21,23</sup>と 2. 細胞培養基材 (Figure 3C)<sup>24</sup>としての応用に大別される。インジェクタブルゲルの例では、チキソ性を利用して注射器からゲルを通し、体内に注射するという方法がとられる。田口らはリポソームと末端をコレステロール基で修飾した PEG を混合することで自己修復ゲルを合成することに成功した<sup>21</sup>。この自己修復ゲルは剪断力が強くかかる条件において架橋点が破壊され粘性が一時的に下がることが明らかとなっている。そのため注射針を容易に通過する。しかしながら剪断力が緩和されるとゲルの架橋点の再結合によって力学強度が元の数値に戻り、粘弾性を回復するという点にある。これにより今までは体内への埋植を外科手術に頼らざるを得なかったハイドロゲルという物質を針による注射という非常に低侵襲的な方法によって実現できるようになった。ハイドロゲルは、薬物徐放は細胞支持の足場としてよく利用される物質であり、今後のハイドロゲルの体内使用に関して、低侵襲的な方法が提案されたという点で非常に有意義な応用例である。

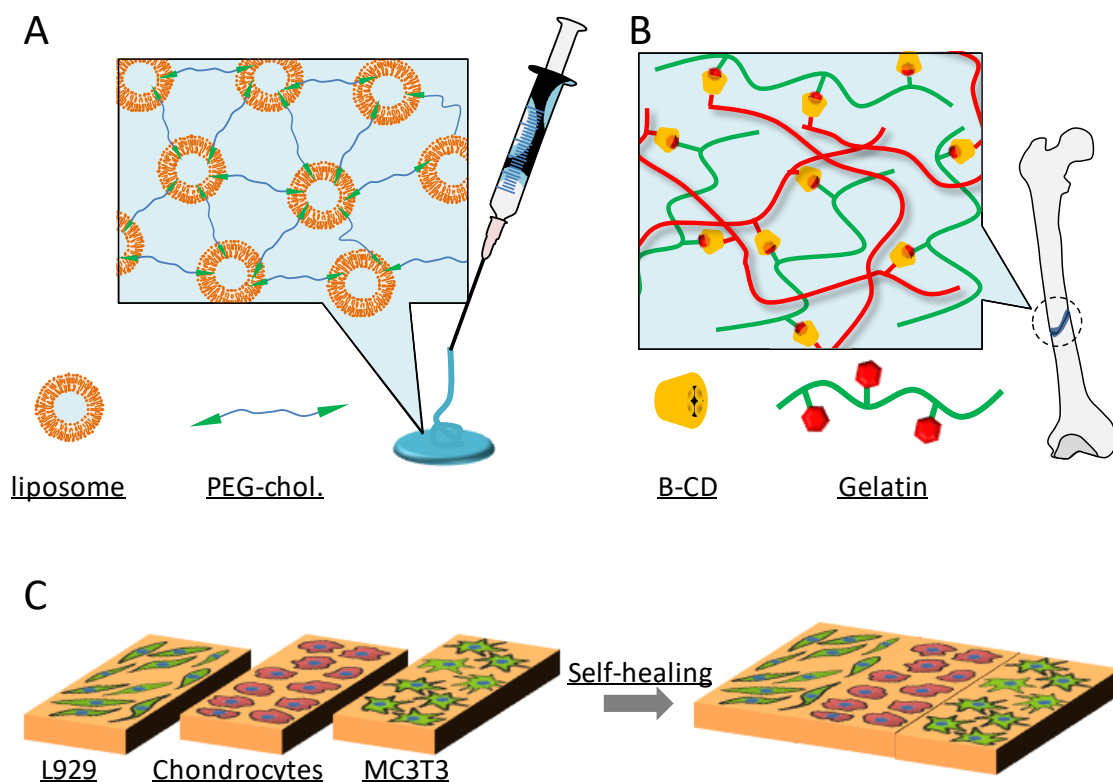


Figure 3-2. Biomedical applicably self-healing materials. Injectable self-healing hydrogel can be applied for drug release<sup>21</sup> (A) and bone adhesive<sup>23</sup> (B). A self-healing tissue culture scaffold enable to produce interfacial zones between ligament, cartilage and bone (C).<sup>24</sup>

自己修復ゲルを細胞培養基材としての応用する試みは、いまだ始まったばかりの発展途上にある。しかし今後の再生医療の発展に対しては、細胞の解析方法や処理方法に加えて新たな細胞培養用の足場材料の開発が不可欠である。自己修復ゲルは再生医療に対し、新たな細胞培養足場材料を提供するための新たな材料として期待されている。細胞培養の足場が自己修復をすることは、培養して増やした別種の細胞を、足場の修復をもとにつなぎ合わせる事が出来るという利点を持つ。細胞

種に応じてそれぞれが接着しやすい硬さ、濡れ性、吸着性蛋白質などを変えてた細胞培養足場を作ることも困難であれば、特定の部位に狙って細胞を播種することもそれ以上に難しい。そのため、自己修復ゲルで、それぞれ目的の細胞を別々に培養しておき、細胞が十分に増殖してから目的の位置と形状に組み上げていくという方法をとれば、細胞の播き分けをせずに済むため、非常に効率が良い。実際に異なる細胞種を別々の自己修復材料の上に播き、自己修復によって組み合わせた研究例が存在する。Wuらは線維芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞をそれぞれ別々に脂肪族ポリセバケートを主原料とする自己修復材料上で培養し、それぞれの基材を自己修復によって一体化させる実験を行っている。自己修復後その細胞種はつなぎ目なく混ざり合い、高い生存率を維持したまま増殖を続けたという結果が得られた<sup>24</sup>。これは、培養する細胞種を上手に選択すれば、骨と靭帯のつなぎ目や骨と靭帯のつなぎ目などを人工的に再現することが可能であることを示唆し、人工靭帯や人口軟骨の創生といった技術的に難しかったことも、もはや実現可能であるということを示している。この技術によって、今後、再生医療は足場材料の形状の自由度と取り扱う材料の幅を拡げ、様々な臓器を人工的に作りだすことが出来る実用的な最先端医療に貢献する材料である。

### 3.4. 実験

#### 3.4.1. 本実験の概要

自己修復ハイドロゲルのネットワーク中に光架橋性高分子を貫入させた自己修復テンプレート (self-healing template; SHT) を合成した。SHT を積層、もしくは折りたたむことによって任意形状を形成した。貫入する高分子を光架橋する前の SHT の自己修復に伴う界面強度の上昇を引張試験によって明かとし、SHT 断片の界面における新たなポリマーネットワークの形成を SEM によって確認した。さらに、光架橋性高分子由来の任意形状ゲルを構築した後の SHT の洗い流しをマイヤーヘマトキシリン染色法によって明らかとし、SHT を用いて任意形状の光架橋性高分子ゲルを形成できることを明らかとした。

#### 3.4.2. SHT の合成

4-arm PEG-phos と poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) をそれぞれ 50 mg/mL, 100 mg/mL の濃度になるように同一のサンプル瓶において 6 wt% irgacure 2959 水溶液に溶解させ、混合水溶液を調整した。このポリマー水溶液に対して 0.3 M の  $VCl_3$  水溶液を混合し、SHT を作製した。poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-hydroxymethyl methacrylamide) acrylate (PNHA) が貫入した SHT も同様の組成比にて作製した。

##### 3.4.2.1. PEGDA の合成

光架橋性高分子は、それぞれポリマーの末端、または側鎖の水酸基に対してショットテンバウマン反応によってアクリロイル基を導入して合成した。具体的には、10 g の PEG ( $M_n = 3,350, 6,000$  および 10,000 g/mol) を 100 mL の THF/dichloromethane = 1/1 の混合溶媒に完全に溶解させた。窒素バブリング、強攪拌をおこないながら氷冷下において、ポリマー溶液に対して 20 mL の Acryloyl chloride を等圧滴下ロータを用いて静かに混合した。窒素バブリングを続けながら、副反応物として産生される塩化水素を除去し、20 h 反応を続けた。反応後のサンプルは、体積比 20 倍の diethylether に対して 3 回、再沈殿させ、精製した。精製後のサンプルを減圧濾過で回収し、diethylether で 3 回洗浄したのち、減圧下にて乾燥させた。

##### 3.4.2.2 PNHA の合成

化学量論比 10 : 1 の NIPAAm と HMAAm を DMF に溶解させ、NIPAAm のモル濃度が 1M になる

ように調整した。この溶液に対してNIPAAmに対して化学量論比0.06倍の2,2'-azobis(isobutyronitrile)を開始剤として溶解させた。重合管の口をセプタムキャップで閉じ、マグネティックスターラーで溶液を攪拌しながら窒素バブリングを30分おこない、溶液中の溶存酸素を除去した。溶液は70°Cにおいて攪拌を続けながら20h重合反応させた。所定時間の重合反応の後、重合管を凍結させ、大気開放して反応を停止させた。凍結したサンプル溶液を再度融解させ、溶液の体積比20倍量のジエチルエーテルに2回再沈殿をして精製した。精製したサンプルは減圧濾過によって回収し、減圧下で乾燥させて使用した。

重合したPNH 1gを窒素フローをおこないながら、THF:dichloromethane = 1:1混合溶媒30mLに溶解させ、PNHが有する水酸基に対して化学量論比8倍のtriethylamineを混合した。混合溶液を-30°Cに保持し、激しく攪拌をしながら、triethylamineと等物質量のacryloyl chlorideをゆっくり加えた。温度を室温に戻して3h反応させた。反応後、サンプル溶液を20倍量のジエチルエーテルにて再沈殿させ、減圧濾過、減圧乾燥をおこないサンプルを回収した。乾燥後のサンプルをメタノールに溶解させ、分子量分画3500のセルロース透析膜を用いて外液をメタノールにして3日間透析を行った。外液を水に換えて1日透析を引き続きおこなってから凍結乾燥によって白色粉末のサンプルを得た。

### 3.4.3. SHTの光架橋

作製したSHTを任意の形に切り出し、積層したのち切断界面を貼合わせ、所定時間自己修復させた。紫外線ランプを用いて、修復したサンプルに対して紫外線(強度; 15 mW cm<sup>-2</sup>)を15分間照射し、貫入した光架橋高分子を架橋した。光架橋後のサンプルは、3日間、水中に浸漬させて残留する金属イオンと4-arm PEG-phosを洗い流した。

### 3.4.4. サンプルの引張試験

PEGDAを貫入させたダンベル型のSHTをJIS規格(ダンベル状8号形)に従って形成した方に流し込んで成型した。作製したSHTの中心をから長さ方向に対して垂直に切断し、切断した界面を張り合わせた後、所定時間(0分、30分、60分、120分、180分)自己修復させた。修復後のSHTサンプルに対して15分間、紫外線(15 mW cm<sup>-2</sup>)を照射させた。紫外線照射後、サンプルを水中に3日間浸漬させて残留イオンと4-arm PEG-phosを取り除き、引張試験機を用いてサンプルの破断強度を調べた。各サンプルは3 mm/minの速度で引張り、サンプルが破断するまで測定を続けた。

### 3.4.5 架橋したPNHAゲルの温度応答性

PNHAが貫入したSHTをシリコン性の型(5 mm x 5 mm x 1 mm; 縦 x 横 x 高さ)にて作製したのち、紫外線を同様の強度と時間でサンプルに照射し、PNHAゲルを架橋し、1日間水中浸漬させ精製した。精製後のサンプルを40°Cの水に浸漬させ、0から10分の間、1分間隔でゲルの質量を測定し、ハイドロゲルからの脱水挙動を定量的に観察した。

### 3.4.6 SHTから合成したPEGDAゲル、PNHAゲルのヘマトキシリン染色

SHTに対して紫外線を照射し、得られたハイドロゲルをマイヤーヘマトキシリン溶液に2分間浸漬させた。浸漬後のハイドロゲルサンプルを水中に保持し、37°Cの高温振とう機を用いて所定時間(8hおよび24h)振とうさせた。サンプルの呈色変化を経時的に光学顕微鏡で観察した。

### 3.5. 結果と考察

#### 3.5.1. SHT を架橋する金属イオンの選定と修復性

2 章にて述べたように、金属イオンによって 4-arm PEG-phos の架橋を完了するまでに要する時間は

金属イオン種によって異なる(第 2 章 Figure 2-6 参照)ということが明らかであった。今回の検討では、テンプレートという形で自己修復ゲルを手に入れる必要があったため、型に流し込んで形状を整えられた方が望ましい。そのため架橋に時間を要する  $V^{3+}$  を 4-arm PEG-phos の架橋イオンとして添加した。また、 $V^{3+}$  の吸光領域は、紫外線に特有の波長の光を吸収しないということが紫外可視分光測定によって明らかとなった(Figure 3-3)。以上二点の理由により、本検討には  $VCl_3$  を架橋用の添加金属水溶液として用いることにした。

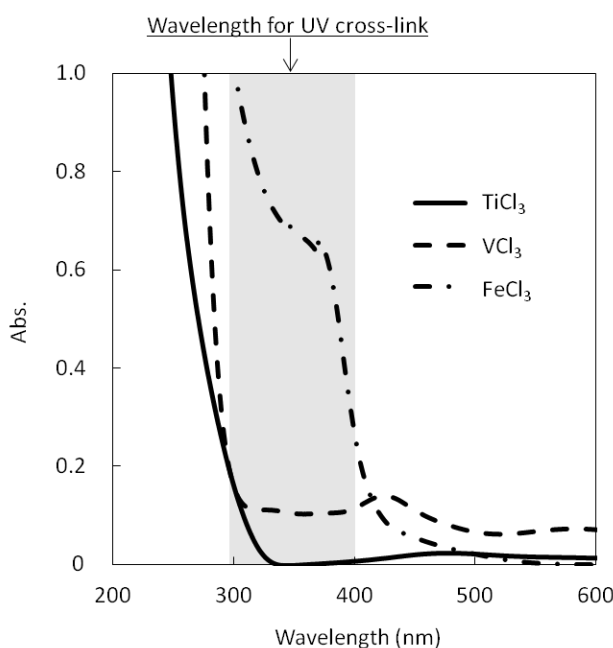


Figure 3-3. Absorbance spectra of  $FeCl_3$ ,  $TiCl_3$  and  $VCl_3$  aqueous solution ( $8.3 \times 10^{-3}M$  each).  $FeCl_3$  solution shows the absorbance wavelength of 300-400 nm. This wavelength range is utilized for UV crosslinking of PEGDA gel.

#### 3.5.2. SHT のテンプレートとしての性能評価

作製した SHT の修復特性は切断界面の顕微鏡観察によって目視で行った。切断した SHT の界面は、時間経過ごとに徐々に小さくなっていき、120 分後には界面が消失することが観察された(Figure 3-4 A)。すなわち、修復時間依存的に界面の傷が修復したということである。さらに SHT に貫入する高分子の界面での分散性を Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) の界面の移動から推測した。蛍光ラベル化された dextran は SHT の貼合わせ時間に伴って界面を移動し、徐々に移動距離を長くしていく様子が観察された(Figure 3-4 B)。切断し、張り合わせた後に所定時間自己修復させた自己修復テンプレートに対して紫外線を照射させることで得られた光架橋ゲル(PEGDA ゲル)の破断強度を引張試験によって評価した。結果としてゲルの破断強度は紫外線照射前に与えた自己修復時間に依存して強くなった(Figure 3-4 C)。PEGDA の光架橋前に修復のための時間を与えていない自己修復テンプレートに関しても、界面の強度は 40 kPa を示したが、自己修復時間に伴って強度は上昇し、3 時間自己修復させた自己修復テンプレートを光架橋した場合は、平均で 80 kPa を示す

に至った。この 80 kPa という値は、破壊を予め加えていない自己修復テンプレートをそのまま架橋した場合の強度と非常に近い値を示していた。換言すれば、3 時間の自己修復によって自己修復テンプレートの界面が完全に修復されたことによって、最終的に得られる PEGDA ゲルの強度が上昇したと考えられた。テンプレート間の高分子の移動も相まって、それぞれの自己修復テンプレートの間での PEGDA が形成するネットワークが密になったと考えられる。この自己修復テンプレートは、紫外線を照射する前であれば水中に浸漬させておくと溶解することが明らかとなった。Figure 3-4 D において、自己修復テンプレートを水中に浸漬させたときの質量変化と、その時の様子を示す水ゲルの写真を示している。自己修復テンプレートの質量変化から、一般的な水ゲルと同じように水中において膨潤したのち、特有の質量減少挙動を示すことが分かった。もちろん、自己修復テンプレートの架橋点の形成がリン酸基と金属イオンの間で起こる錯形成を駆動力としていることを考えると、過剰の水分子に取り囲まれることによってポリマー鎖の運動性が上昇することに加えて、膨潤に伴って 4-arm PEG-phos を取り囲む水分子の数が数が相対的に大きくなることも、ゲルの崩壊をもたらす要因であると考えられた。リン酸と金属の間での結合と解離は、平衡反応であるため、大きく水和した 4-arm PEG-phos は、結合が解離した際に水相に移動しやすいということが考えられる。いずれにしても、自己修復テンプレートは、水中に含浸させることで崩壊させることができた。

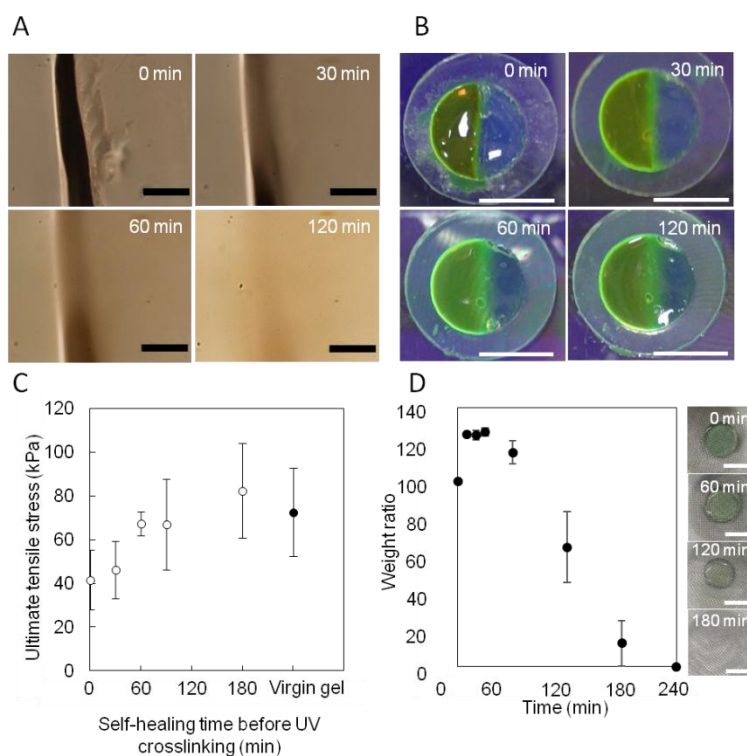


Figure 3-4 (A) Microscopic observation of fluidic behavior for SHT (scale bar = 200  $\mu\text{m}$ ). Time-lapse images show the capability of scratch repair. (B) Two SHT samples were prepared and each sample was cut into two pieces. One of them was colored with FITC-dextran for clarity. After pressing the fractured surfaces together, they merged into a single piece (scale bar = 1 cm). (C) Effect of self-healing time before UV irradiation on the adhesive strength of the resulting PEGDA gels after UV irradiation ( $n = 3$ ,  $p < 0.05$ ). (D) Erosion behavior of SHT (scale bar = 1 cm). Mass changes were plotted at the predetermined time ( $n = 3$ ,  $p < 0.05$ ).

4-arm PEG-phos の分子量の大きさを考えた際に、実際に PEGDA ゲルネットワーク中から 4-arm PEG-phos が外れてゲルの外に放出されているのか、という議論は、単純に自己修復テンプレートが水中で溶解するという点だけでは証明できない。そこで、4-arm PEG-phos の末端に存在するリン酸基に対して特異的に結合する染色試薬として、ヘマトキシリンを用いた染色試験を行った。ヘマトキシリンは、核酸染色などに用いられ、特有の紫色を発色している。このヘマトキシリンは、Figure 3-5 に示すように、金属イオンを介してリン酸基と特異的に結合することができる。ヘマトキシリンは、溶液中に含有される酸化剤によってヘマテインとなり、ミョウバン由来の  $Al^{3+}$  と結合する。リン酸も同様に  $Al^{3+}$  と結合するため、結果としてリン酸基が多く分布する場所が紫色に染まる。自己修復テンプレートを紫外線によって架橋し、ヘマトキシリン溶液で染色を行ったところ、ゲルは鮮やかな紫色を呈色した。このゲルを  $37^{\circ}C$  の水中に含浸させ、ゲルの変色の様子を観察したところ、Figure 3-6 に示す通り、ゲルは 8 時間で薄い紫色へ、そして 36 時間後にはヘマトキシリン由来の紫色がほとんど確認できないほどに脱色された。この結果から、架橋した PEGDA ゲルから 4-arm PEG-phos が抜けているということが確認された。すなわち、最終的に得られるハイドロゲルに対して不純物となり得る 4-arm PEG-phos を、水中への浸漬によってゲルから取り除くことができるということが示唆された。

Mechanism of Hematxylin staining of phosphate group.

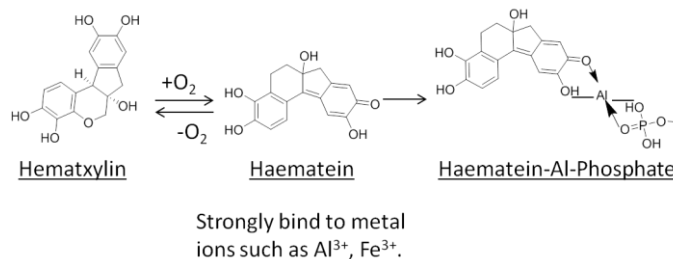


Figure 3-5. An illustration of binding between hematein molecule and phosphate group via metal-ligand coordination.

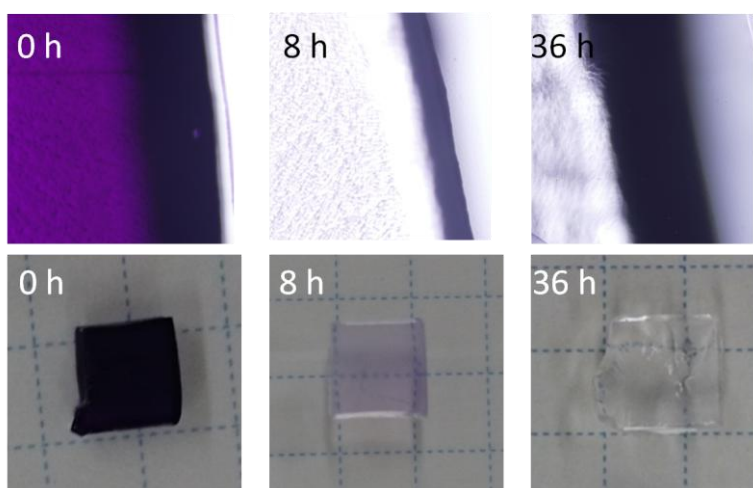


Figure 3-6. Photographs of hydrogel which stained by hematein after immersing in water for the determined time.



### 3.5.3. SHT 法による異なる分子量を有する PEGDA ゲルの貼合わせ

SHT に貫入させる PEGDA の分子量をそれぞれ異なるものに変えた際に、最終的に得られるハイドロゲルがどのような状態になるかを観察した。例えば、 $M_n = 10,000$  と  $M_n = 3,350$  の PEGDA を貫入させた SHT を貼合わせ、3 時間自己修復させた後、紫外線を照射し、テンプレートを水中に浸漬させて取り除いた際には、非常に大きな膨潤ミスマッチが界面において観察された。大きな膨潤ミスマッチが生じているものの、界面における破断は見られなかった(Figure 3-6 A)。これは、SHT の界面において、テンプレートの自己修復による接着が起こっているためであると考えられる。さらに、数平均分子量 10,000, 6,000, 3,350 の PEGDA を貫入させた自己修復テンプレートを Figure 3-6 B に示すようにモザイク状に貼合わせ、3 時間自己修復させた後、紫外線照射によって架橋した。このゲルを同様に 24 時間水に浸漬させて余分なテンプレートを取り除いたところ、特有の湾曲を持つモザイク状のゲルを作製することができた。このモザイクゲルは、界面において大きな膨潤ミスマッチが生じているものの、界面において破断は確認されなかった。大きな膨潤ミスマッチに由来する内部応力を緩和するためと思われるゲルの特有の湾曲が確認された。以上の結果から、自己修復テンプレートを貫入するポリマーの分子量によらず、界面における修復と接着が確認できた。これは、界面における PEGDA のネットワークが新生しているためである。SEM 観察の結果、ゲルのつなぎ目部分に新しいポリマーネットワークが形成されていることが確認された。以上の結果から、ハイドロゲルはテンプレートの自己修復によって、貫入する PEGDA の分子量によらずよく接着ができているということが分かった(Figure 3-7 C)。

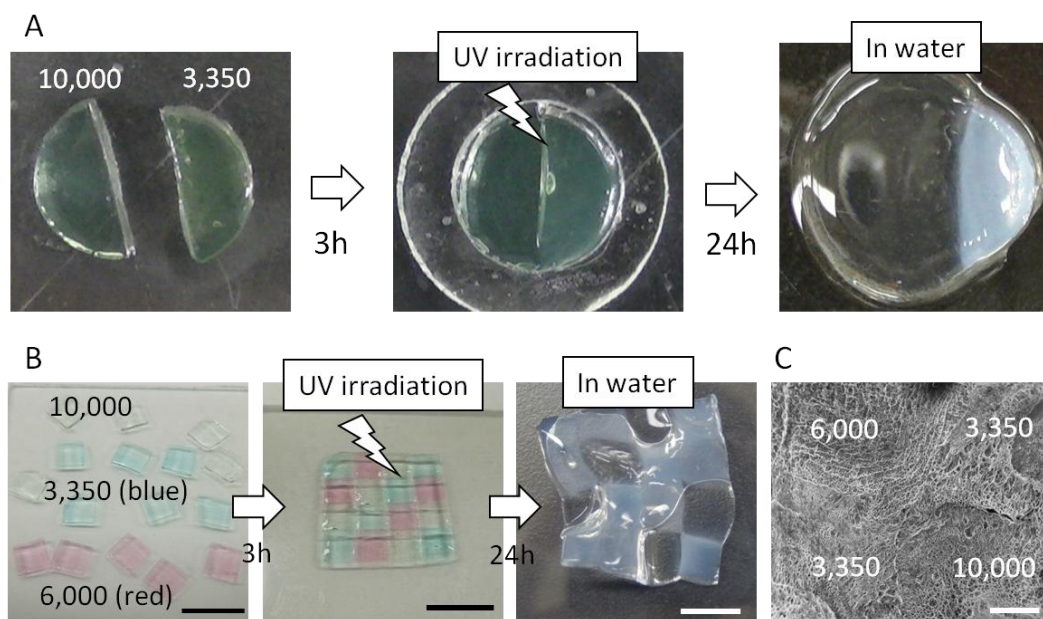


Figure 3-7. (A) Photographs of two SHT samples containing different molecular weights of PEGDA ( $M_n=3,350$  and  $10,000$ ). After cutting into two pieces and pressing the fractured surfaces together for 3 hours, PEGDA was crosslinked by UV irradiation. (B) Photographs of a mosaic type hydrogels. Three SHT samples containing different molecular weights of PEGDA ( $M_n=3,350$ ,  $6,000$ , and  $10,000$ ). After attaching these piece together, PEGDA was crosslinked by UV irradiation (scale bar = 10 mm). (C) SEM image of adhesive interfaces in the mosaic hydrogel (scale bar = 1 mm).

### 3.5.4. SHT 法による異なる高分子ゲルの貼合わせ

3.5.3.において、異なる分子量を持つ同種類のポリマーの張り合わせに成功した。本項では異種分子間におけるゲルの貼合わせが可能かどうかを検討した。PEGDA および PNHA が貫入した自己修復テンプレートをそれぞれ作製し、Figure 3-8 A に示すようにそれぞれが異なる分子が貫入したテンプレートに触れるように貼り合わせた。PNHA の熱による相転移を防ぐために4°Cにおいて1時間、自己修復をさせた後、紫外線を照射し、内部に貫入する光架橋分子を架橋した。同様に水中に浸漬させてテンプレートを取り除いて40°Cまで加温したところ、PNHAによって構築されているゲルの領域は相転移によって脱水するという現象が観察された(Figure 3-8)。脱水によって生じる膨潤ミスマッチによってもやはりハイドロゲルの界面の剥離は見られず、PEGDA, PNHA それぞれのポリマー由来のゲルの界面がきれいに接着されているということが明らかとなった。

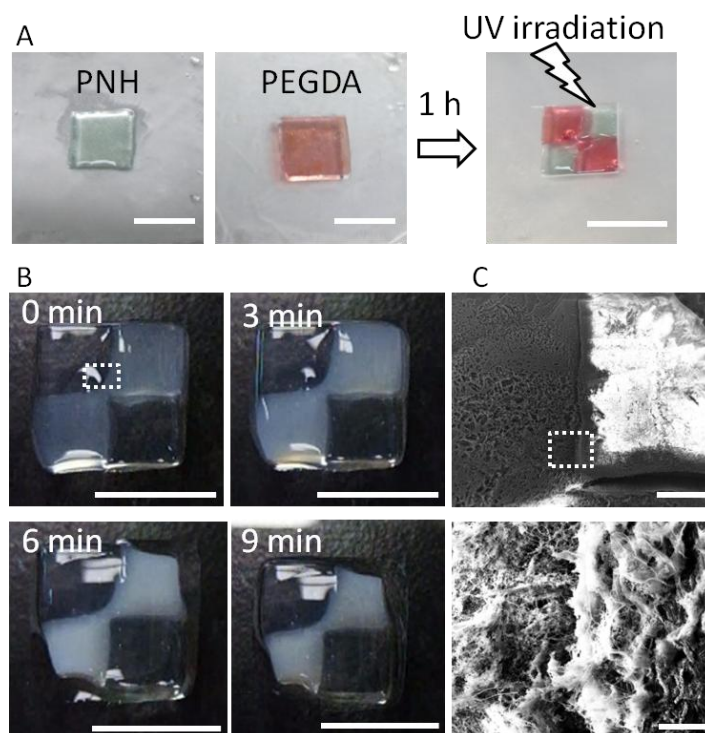


Figure 3-8. (A) Preparation of mosaic type hydrogels using PNH and PEGDA (Scale bars = 1 cm). (B) The mosaic hydrogel was heated at 40°C (Scale bars = 1 cm). (C) SEM images of adhesive interfaces in the mosaic gel (Scale bars = 1 mm (top) and 50  $\mu$ m (bottom)).

### 3.5.5. SHT を用いて作製したゲルと溶液から作製したゲルの相違点

ハイドロゲルを自己修復テンプレートの内部で架橋した場合と、光架橋高分子を溶液から直接架橋した場合で、それぞれ物性に変化があるのかを確認するため、PEGDA ゲルの架橋密度を求めた。ゲルの架橋密度の算出には、Flory-Rehner を用いた。分子量 3,350 と 6,000 の PEGDA をそれぞれ自己修復テンプレート内部で架橋したものと、溶液から架橋したものでは、架橋密度が異なるということが分かった。Figure 3-9 から見て取れるように自己修復テンプレートで架橋した場合の PEGDA ゲルは、架橋密度が低くなる傾向があった。また、その傾向は PEGDA の分子量が大きくなるほど顕著であった。原因の考察としては、PEGDA の移動度が自己修復テンプレートのネットワークによって制限されているということが考えられた。ゲルの架橋に関しては光重合を用いているため、

ラジカル化された PEGDA が他の PEGDA 分子に対して反応しなければならない。よって、PEGDA の分子運動が制限されると、分子間の衝突が抑制され、ゲルの架橋密度が減少したと考えられる。この考察は、PEGDA の分子量が大きくなるほどゲルの架橋密度減少するというにも合致している。

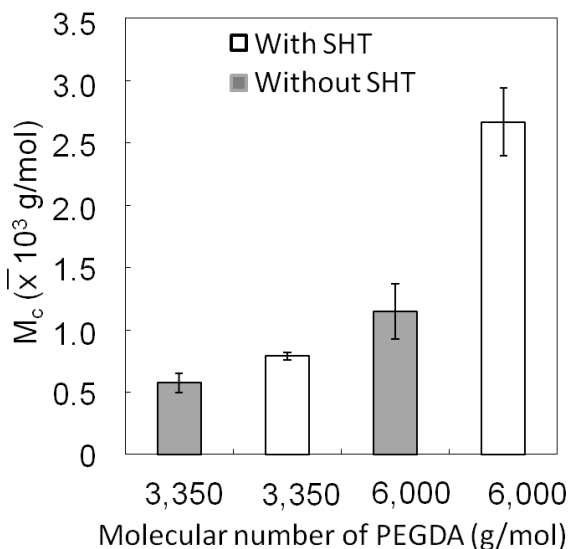


Figure 3-9. Crosslink density of each hydrogels with and without SHTs.

さらに、PNHA を原料とする温度応答性ゲルを加温した際の、脱水和を質量測定によって明らかとした(Figure 3-10)。結果として、テンプレート内で架橋した PNHA ゲルは水溶液から架橋したそれよりも鋭敏な温度応答を示すということが分かった。この現象は、PNHA ゲルを架橋してゲルを作製したのち、テンプレートを洗い流した際に、テンプレートの母材となった自己修復ゲルが抜けた部分が微細なチャンネルとなり、そこを介して水のやり取りが行われたためであると考えられる。

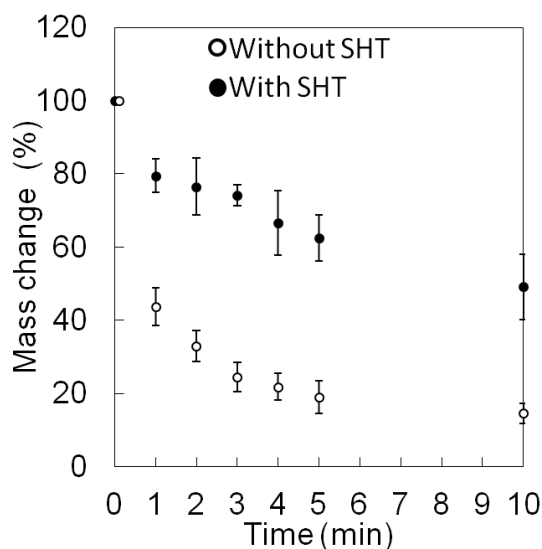


Figure 3-10. Crosslink density of each hydrogels with and without SHTs.

### 3.6. 結言

3章において、自己修復ハイドロゲルのネットワーク中を光架橋高分子が貫入する自己修復テンプレートを作製することに成功した。自己修復テンプレートは、単純に貼り合わせた界面を自己修復によって接着し、紫外線照射によって架橋することができた。また、最終的に得られたゲルの界面の強度は、紫外線照射前の自己修復時間に依存するということが分かった。自己修復テンプレート内部で光架橋高分子を架橋した場合と、光架橋高分子の水溶液を直接架橋した場合では、得られるゲルの性質が異なるということが明らかとなった。しかしながら、自己修復テンプレートは任意形状のゲルを作製するためには十分に役立つツールであると考えられ、様々なゲルデバイスを作製することに役立つことが期待された。

### 3.7.参考文献

1. Karpiak, J. V.; Ner, Y.; Almutairi, A., Density gradient multilayer polymerization for creating complex tissue. *Adv Mater* **2012**, *24* (11), 1466-70.
2. Muroi, H.; Hidema, R.; Gong, J.; Furukawa, H., Development of Optical 3D Gel Printer for Fabricating Free-Form Soft & Wet Industrial Materials and Evaluation of Printed Double-Network Gels. *Journal of Solid Mechanics and Materials Engineering* **2013**, *7* (2), 6.
3. Sato, T.; Ebara, M., Fabrication of Temperature-responsive Hydrogels with Arbitrary Geometries by Using Self-healing Template. *Chemistry Letters* **2016**, *45* (12), 1394-1396.
4. Sato, T.; Uto, K.; Aoyagi, T.; Ebara, M., An Intriguing Method for Fabricating Arbitrarily Shaped “Matreshka” Hydrogels Using a Self-Healing Template. *Materials* **2016**, *9* (11), 864.
5. Hoare, T. R.; Kohane, D. S., Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* **2008**, *49* (8), 1993-2007.
6. Tsitsilianis, C., Responsive reversible hydrogels from associative “smart” macromolecules. *Soft Matter* **2010**, *6* (11), 2372.
7. Ionov, L., Hydrogel-based actuators: possibilities and limitations. *Materials Today* **2014**, *17* (10), 494-503.
8. Tanaka, T., Kinetics Of Phase Transition In Polymer Gels. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **1986**, *140*, 8.
9. Akira Matsumoto, T. K., Daijiro Shiino, and Kazunori Kataoka, Swelling and Shrinking Kinetics of Totally Synthetic, Glucose-Responsive Polymer Gel Bearing Phenylborate Derivative as a Glucose-Sensing Moiety. *Macromolecules* **2004**, *37*, 9.
10. Yoshida, R.; Uchida, K.; Kaneko, Y.; Ssakai, K.; Kikuchi, A.; Sakurai, Y.; Okano, T., Comb-type grafted hydrogels with rapid deswelling response to temperature changes. *Nature* **1994**, *374*, 3.
11. Techawanitchai, P.; Ebara, M.; Idota, N.; Asoh, T.-A.; Kikuchi, A.; Aoyagi, T., Photo-switchable control of pH-responsive actuators via pH jump reaction. *Soft Matter* **2012**, *8* (10), 2844.
12. Sato, T.; Ebara, M.; Tanaka, S.; Asoh, T. A.; Kikuchi, A.; Aoyagi, T., Rapid self-healable poly(ethylene glycol) hydrogels formed by selective metal-phosphate interactions. *Phys Chem Chem Phys* **2013**, *15* (26), 10628-35.
13. Kotsuchibashi, Y.; Ebara, M.; Sato, T.; Wang, Y.; Rajender, R.; Hall, D. G.; Narain, R.; Aoyagi, T., Spatiotemporal control of synergistic gel disintegration consisting of boroxole- and glyco-based polymers via photoinduced proton transfer. *J Phys Chem B* **2015**, *119* (6), 2323-9.
14. Peng, F.; Li, G.; Liu, X.; Wu, S.; Tong, Z., Redox-Responsive Gel-Sol/Sol-Gel Transition in Poly(acrylic acid) Aqueous Solution Containing Fe(III) Ions Switched by Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2.
15. Miyata, T.; Asami, N.; Uragami, T., A reversibly antigen-responsive hydrogel. *Nature* **1999**, *399*, 4.
16. Shiino, D.; Murata, Y.; Kataoka, K.; Koyama, Y.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y., Preparation and characterization of a glucose-responsive insulin-releasing polymer device. *Biomaterials* **1994**, *15* (2), 8.
17. Matsumoto, A.; Ishii, T.; Nishida, J.; Matsumoto, H.; Kataoka, K.; Miyahara, Y., A synthetic approach toward a self-regulated insulin delivery system. *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, *51* (9), 2124-8.
18. Kataoka, K.; Miyazaki, H.; Bunya, M.; Okano, T.; Sakurai, Y., Totally Synthetic Polymer Gels Responding to External Glucose Concentration: Their Preparation and Application to On-Off Regulation of Insulin Release. *Journal of American Chemical Society* **1998**, *120* (48), 2.
19. Kim, Y. J.; Ebara, M.; Aoyagi, T., A smart nanofiber web that captures and releases cells. *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, *51* (42), 10537-41.
20. Zhang, Y.; Yang, B.; Zhang, X.; Xu, L.; Tao, L.; Li, S.; Wei, Y., A magnetic self-healing hydrogel. *Chem Commun* **2012**, *48* (74), 9305-7.

21. Rao, Z.; Inoue, M.; Matsuda, M.; Taguchi, T., Quick self-healing and thermo-reversible liposome gel. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2011**, *82* (1), 196-202.
22. Cui, J.; del Campo, A., Multivalent H-bonds for self-healing hydrogels. *Chem Commun.* **2012**, *48* (74), 9302-4.
23. Feng, Q.; Wei, K.; Lin, S.; Xu, Z.; Sun, Y.; Shi, P.; Li, G.; Bian, L., Mechanically resilient, injectable, and bioadhesive supramolecular gelatin hydrogels crosslinked by weak host-guest interactions assist cell infiltration and in situ tissue regeneration. *Biomaterials* **2016**, *101*, 217-28.
24. Chen, S.; Bi, X.; Sun, L.; Gao, J.; Huang, P.; Fan, X.; You, Z.; Wang, Y., Poly(sebacoyl diglyceride) Cross-Linked by Dynamic Hydrogen Bonds: A Self-Healing and Functionalizable Thermoplastic Bioelastomer. *ACS Appl Mater Interfaces* **2016**, *8* (32), 20591-9.

## 第 4 章

### 自己修復テンプレートを用いたゲルデバイスの開発

## 4.1 緒言

3 章で自己修復テンプレート法によって作製されたハイドロゲルは、テンプレートの自己修復によって界面が強く接着されていることが明らかとなった。また、多成分系のゲルの開発にも成功した。4 章では SHT をさらに任意形状に組み立てることでハイドロゲルデバイスの開発に着手した。具体的には、ハイドロゲルを今まで加工が難しく、実際に組み立てられていない形状に加工することができた。また、スマートポリマーと組み合わせることで、ハイドロゲルデバイスの形状を一般的な並行平板状から、任意の形状に成型させることに成功している。

SHT は固体であるため、実際にピンセットで操作でき、任意の形状に畳んだり折ったりすることができる。著者は PEGDA を含む SHT を用いて箱型のゲルを作製することに成功した<sup>1,2</sup>。この箱型形状のハイドロゲルを水溶液前駆体から作製することは容易ではない。例えば現在開発されているバスタブ型 3D プリンター<sup>3</sup>によって、箱型のゲルは作製できるものの、中空状態での作製は困難であり、あらかじめゲルの中にもものを入れた状態での作製は大変難しいと考えられる。SHT を用いて作製した場合、作製自体はすべて手作業で完遂でき、かかる時間も自己修復のための待ち時間だけである。この簡便な方法を用いて中に生物を閉じ込めたハイドロゲルの箱を作ることに成功した。今回は生物を直接ゲルの箱に閉じ込めたが、他にもゲルの箱の中にゲルの箱を閉じ込めたマトリョシカゲルなどの作製も比較的容易に成功した。上記の箱型ゲルは、薬物送達や細胞送達などの研究分野に対しても大いに役立つ潜在性を秘めているということが明らかとなった。さらに、温度応答性高分子を用いた SHT を用いて、特殊形状のソフトアクチュエーターの開発も試みた。PEGDA および PNHA がそれぞれ貫入したひも状の SHT からは、細管状のハイドロゲルを加工することができ、さらにハイドロゲルは温度によって駆動させることが可能であった。細管の中心の空洞は 40°C における収縮が観察され、SHT を使用すれば今まで並行平板が一般的な形状であったゲル由来のソフトアクチュエーターを様々な形状で作製できることを示唆する結果を得た。例えば薬物送達のバルブや毛細血管の収縮を模倣できるような人口血管の開発のように、目的に合わせたゲルデバイスの開発を飛躍的に進められることが期待される。

### 4.1.2. ハイドロゲルを母材としたデバイス開発

#### 4.1.2.1. 薬物、細胞の担体

ハイドロゲルを原料として今まで様々な薬物担体が開発されてきた。薬物の放出の仕組みに関しては、ネットワーク中からの拡散を基本原理とした徐放から、刺激応答によって任意に薬物を徐放できるハイドロゲルへと変遷をむかえ<sup>4,5</sup>、ハイドロゲルの医療に対する貢献は大変大きなものとなってきている。薬剤の担体として活躍してきたハイドロゲルであるが、1960 年代より骨髄移植の成功を皮切りとした細胞医療などの新たな医療の台頭により、ハイドロゲルの担体としての活躍の場は薬剤送達や薬物徐放から、細胞担体や細胞保存へと広がり始めた。細胞をハイドロゲルによって包含した状態で血管に注射すると、細胞が免疫機構によって排除されることなく体内を循環することができる<sup>6,7</sup>。また、ハイドロゲルのサイズ選択的な物質の透過性によって、ゲルに内包した細胞に対しての酸素と栄養分を供給することができる。一方で、白血球はゲルの網目を通過できないため、結局、細胞を白血球から隔絶することができる。例えば、膵臓のランゲルハンス  $\beta$  細胞を PEG のゲル中に保存し、血中のグルコース濃度に対応してインスリンを放出させることができれば、糖尿病の根治ができると考えられる。その優れた生体適合性と、外界との生理活性物質のやり取りができるハイドロゲルは、細胞を用途に応じて目的の箇所に埋植するための担体としてさらに活用を場を広げつつある。



#### 4.1.2.2. ソフトアクチュエーター

ゲルデバイスの中でも、ソフトアクチュエーターは、ゲルデバイスの好例であり、刺激によって任意に形状を変形させることができ、主に人工筋肉への転用が期待されている。ハイドロゲルを材料とするソフトアクチュエーターの研究は、古くは 1992 年に長田らによって発表されている。この研究報告では、dodecyl pyridinium chloride ( $C_{12}PyCl$ )電解質中に poly(2-acrylamide-2-methyl propane)sulphonic acid (PAMPS)ゲルを浸漬させており、電解質水溶液に対してゲルの垂直方向に対して電気を流すことで電気泳動が起こり、ゲル表面に電解質が結合する<sup>8</sup>。これによって PAMPS ゲルの陽極側の表面電荷が減少し、結果としてゲルの表面の親水性が減少し、収縮する。これによって不均一に収縮する部分が生じ、内部応力が生じて屈曲に至る。屈曲の挙動のみならず、有機金属錯体の酸化還元応答によってもアクチュエーターとして機能を発現するものがある。例えばターピリジン-ルテニウム錯体を持つ自励振動高分子を用いてハイドロゲルを開発した。このゲルの錯体の中心に位置するルテニウムイオンに対して酸化還元を与えることで膨潤と収縮をさせることができるということが報告されている。吉田らはこの性質と **BZ** 反応が引き起こす周期的な酸化還元作用を組み合わせることで、心筋の拍動のような周期的な膨潤収縮を起こすソフトアクチュエーターの開発に成功した<sup>9-11</sup>。このハイドロゲルは現在、様々な形状に加工され、湿潤環境や生体環境における物質の輸送への応用が期待されている。ソフトアクチュエーターの多くは、このような膨潤ミスマッチによる内部応力の発生によって屈曲をコントロールするか、もしくは膨潤収縮を連続的に起こし、拍動型の運動をゲルに起こさせることで、その機能を果たす。スマートポリマーはその構成成分として活用されてきている。最も一般的なゲルのアクチュエーターの形状は、並行平板上のゲルを二層に積層させたもので、二層のうち一方をスマートポリマーによって構築することで、特定の刺激に応じた屈曲を実現することが可能である<sup>12</sup>。例えば、Prapatsorn らは CIPAAm ゲルと acrylamide ゲルを電気泳動法によって張り合わせ、pH 変化に応答するソフトアクチュエーターを開発した。ネットワーク中に o-nitrobenzaldehyde と呼ばれる photo acid generator (PAG)が存在しており、紫外線照射によって PAG がプロトンを放出する<sup>13</sup>。これによって直接的な酸性溶液を添加せずとも、紫外線の照射によって屈曲挙動を示す大変興味深い研究例である。

優れたアクチュエーターの研究例が数多く報告されているものの、形状に関しては平板の二層薄膜であり、立体的に積層された他成分系のハイドロゲルからアクチュエーターを作製したという報告例は著者が知る限りされていない。この理由としては、3 章でも述べたように、前駆体が水溶液であることに起因する。そのため、4 章では自己修復テンプレート法を活用し、立体的に他成分のゲルが積層されたハイドロゲルがどのような駆動を起こすのかを実験検証した。

## 4.2. 実験

### 4.2.1. 箱型ゲルの作製

PEGDA と 4-arm PEG-phos 水溶液を 50 mm x 50 mm x 1 mm (縦 x 横 x 高さ)の型に流し込み、0.3 M の  $VCl_3$  水溶液を加え、よく混合し SHT を作製した。PET フィルムを用いて一辺が 8 mm の立方体の展開図を切り出した。SHT を PET フィルムに沿って裁断し、立方体になるように折りたたんだ。この時、PET フィルムは SHT の界面の自己修復が完遂するまでの支持体として使用した。自己修復を 1 h 時間させた後、紫外線ランプを用いて、SHT に紫外線を照射した。紫外線の強度を  $15 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  に設定し、15 分間照射した。

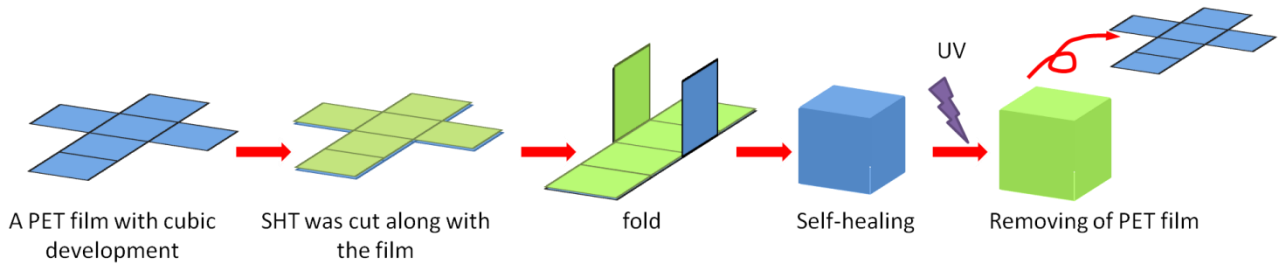


Figure 4-1 Schematic illustration of box-shape hydrogel preparation using the SHT.

#### 4.2.2. 箱型ゲル内の pH 測定

作製した箱型ゲルを PBS 中に 1 日浸漬させ、残留する金属イオンと 4-arm PEG-phos を除去した。箱型ゲル内に細胞培養液 (DMEM) を 400  $\mu$ L 注入し、0.1M HCl に浸漬させた。箱型ゲルに保持された DMEM の pH を pH メーターで経時的に測定した。

#### 4.2.3. ゲルボックス内での NIH3T3 の生存率の確認

ハイドロゲル内部に NIH3T3 を注射器で注入し、そのゲルを 0.1 M 塩酸に 10 分間浸漬させた。浸漬させた後、ハイドロゲルを塩酸から取り出し、中から細胞を注射器で吸い出した。ゲルから回収した細胞懸濁液は PBS によって希釈し、遠心分離によって細胞成分のみを沈殿させ、洗浄、回収した。回収した細胞を培養液に分散させ、96 穴細胞培養皿に播種した。播種した 3 時間後、alamar blue 溶液を添加し、細胞の活性を評価した。活性評価は最初の評価から 1 日間隔で 3 日間おこなった。コントロールとして、細胞に対して 0.1M 塩酸を用いた酸処理を行わなかった細胞群と、ゲルに内包せずに直接塩酸処理を 10 分間おこなった細胞群を用意し、それぞれの細胞活性の評価を行った。

それぞれの酸処理後の細胞に対して、細胞の生存率を live dead 試薬を用いて評価した。酸処理後のそれぞれのサンプルを PBS で洗浄し、分散させた後、live dead 試薬を添加し、細胞の蛍光呈色を光学顕微鏡で観察した。

#### 4.2.4. キャピラリー状ゲルの作製

PEGDA と 4-arm PEG-phos の混合溶液を 40 mm x 2 mm x 2 mm (縦 x 横 x 高さ) の型に流し込み、0.3 M  $VCl_3$  水溶液を加え、よく混合した。同形状の型に PNHA と 4-arm PEG-phos の混合水溶液を流しこみ、同様に  $VCl_3$  水溶液を加えよく混合した。作製した PEGDA-SHT と PNHA-SHT を 10 mm 間隔に裁断し、PEGDA-SHT と PNHA-SHT を互い違いに配置し切断面を接触させた。直径 0.3 mm のガラスキャピラリーを SHT の長さ方向に対して挿入した。4°C で 1 h 界面を自己修復させた後、紫外線 (15  $mW \cdot cm^{-2}$ ) を 15 分間照射した。照射後、ガラスキャピラリーを取り外し、水中に 1 日浸漬させた。

#### 4.2.5. キャピラリーゲルの熱駆動試験

作製した細管状のハイドロゲルを 40°C に設定したサーモプレートに載せ、ゲルの内径を顕微鏡で測定した。ゲルの内径を 1 分間隔で計測し、単位時間ごとの変化を観察した。加えてキャピラリー状ゲルの PNHA 組成部分を長さ方向に対して垂直に切断した。切断したゲルの断面を同様に 40°C に加温し、温度応答挙動を観察した。

### 4.3. 結果と考察

#### 4.3.1. 箱型ゲル作製

SHT と支持体として PET フィルムを用いることで、中空で箱型のハイドゲルを構築することに成功した。箱型にハイドロゲルを折りたたみ、紫外線を照射した後、箱型ゲルを水中に浸漬させたところ、水中で浮遊した。これはゲルによって保持された空気によって浮力を得た結果であるが、強調したこととして箱型に加工する際に折りたたんでつなぎ合わせた SHT の界面が隙間なく修復されているということである。すなわち、空気の漏れ出る隙間がなく、きれいに接着されているということがこの検討から明らかとなった。さらにこのゲルを水中に保持させた状態で7日間静置させた後も、箱型ゲルは内包した空気を失うことなく、水中に浮遊しているということが明らかとなった。この結果から、SHT から作製した箱型ハイドロゲルの界面は、よく接着がされており、目的の形状を単純な貼合わせによって実現できる潜在性を証明する結果が得られた。界面の状態をよりよく確認、解釈するために、この箱型ゲルのつなぎ目を走査型電子顕微鏡をもちいて観察した。観察のために、箱型のゲルを一度凍結乾燥し、乾燥したサンプルから界面を含む箇所を裁断した。カーボンテープを用いて断片をステージに固定し、15 kV の加速電圧にて電子線を照射し、ゲルの界面を観察した。観察の結果、ゲルの界面において、新しいポリマーネットワークの形成が確認された(Figure 4-2)。

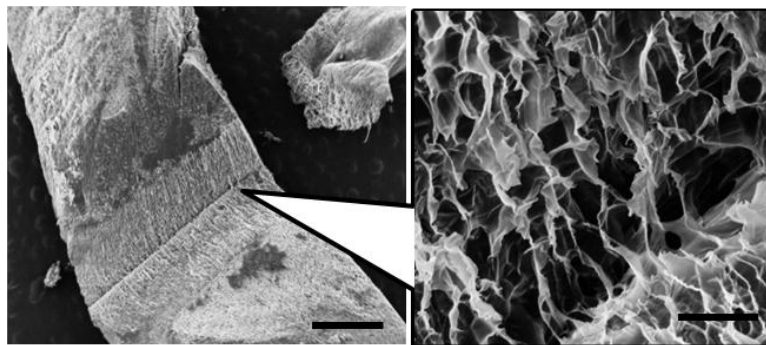


Figure 4-2. SEM images of the adhered interface of the cubic hydrogel box (scale bar = 1 mm and 50  $\mu\text{m}$ )

すなわち、SHT の自己修復に伴って界面が、つなぎ目の無い滑らかな(シームレスな)構造にまで修復されたことが強く示唆された。従来の方法では、中空の閉じた系をハイドロゲルで再現することは困難である。例えば 3D プリンターを用いたとしても、ハイドロゲルは前駆体が水溶液であるので、バスタブ型の方法では中空形状は再現が困難である。一方でゲルの架橋後にゲルを張り合わせる方法を用いるとするならば、ハイドロゲルの界面を隙間なく密着させることが困難であるし、張り合わせた後に電気泳動などの操作を手作業で行うことは非常に困難である。このように従来の方法を用いた場合は作製が非常に時間がかかるか、もしくは作製自体が困難な形状のゲルの加工を実現できた。SHT 法は、今まで、作製が出来ないと考えられていた形状のゲルの作製を可能にした稀有な例であると言える。

このように、今まで水溶液を前駆体としたゲルの加工成型では実現困難なハイドロゲルを比較的容易に作製することに成功した。とりわけ、立体的なゲル積層や、ゲルによる閉じた系は作製が出来たことは、今後のハイドロゲルのデバイス作製に大きな影響を与え、デバイス作製の幅を与えることができると考えられる。

#### 4.3.2. 箱型ゲル内部の溶液、細胞の保存能

箱型ゲルの内部において、細胞培養溶液を保存し、ゲルを外部から酸性にさらしたところ、pH が保たれるということが分かった。内部の溶液の pH 縦軸に、横軸を経過時間にプロットすると Figure 4-3 D に示すように、pH の減少が抑制されるということが分かった。一方で、ゲルに内包している培養液と同体積の培養液を塩酸にさらした場合は、瞬間的に外液の塩酸と同じ pH を示した。塩酸にさらした場合の細胞培養液の pH の減少速度は、ゲルに入れた場合、 $-0.067 \text{ min}^{-1}$  という非常に緩やかな下降を示した。すなわち水素イオンゲルの膜によって、プロトンの拡散が抑制されたことにより内部の pH が保持されたということが明確となった。ゲルの膜の厚みと、透過する物質の分子量にも依存するが、同様に、水素イオンゲルの内外で、物質の移動も制限されるはずである。むしろ、細胞はゲルの網目を透過することがないため、箱型ゲルの内部に細胞を保持することで、溶液に溶存している酸素や養分を透過させ、白血球などの免疫からは隔離することができると考えられる。

Figure 4-3 A に示すように細胞を水素イオンゲルの箱の内部に保存した場合、細胞は高い生存率を示していた。細胞生存率を live dead 試薬によって確認したところ、ゲルに内包した細胞と、酸処理を施さなかった細胞は 90% を超える高い生存率を示した (Figure 4-3 B 生細胞；緑色に呈色した細胞、死細胞；赤色に定食した細胞)。一方で、細胞を直接酸処理した細胞は、ほとんどが死滅していた。この結果は、ゲルの内部において培養液が適正な pH に保持されたことによって、細胞が適切な環境にて保存されたことを強く示唆する。また、それぞれの細胞群の活性を経時観察した結果からも、細胞が健全に保存されていたことが明らかであり、3 日間の細胞培養中において、直接酸処理した細胞群の細胞活性はほとんど示されず、一方で酸処理をしていない細胞、およびゲルの中に保存した細胞に関しては、高い細胞活性を示すことが明らかとなった (Figure 4-3 C)。細胞生存率、および細胞活性の両結果から、確かに水素イオンゲル内部で保存した水素イオンゲルは、過酷環境においても、高い細胞活性と細胞生存率にて保存されていたということが分かった。

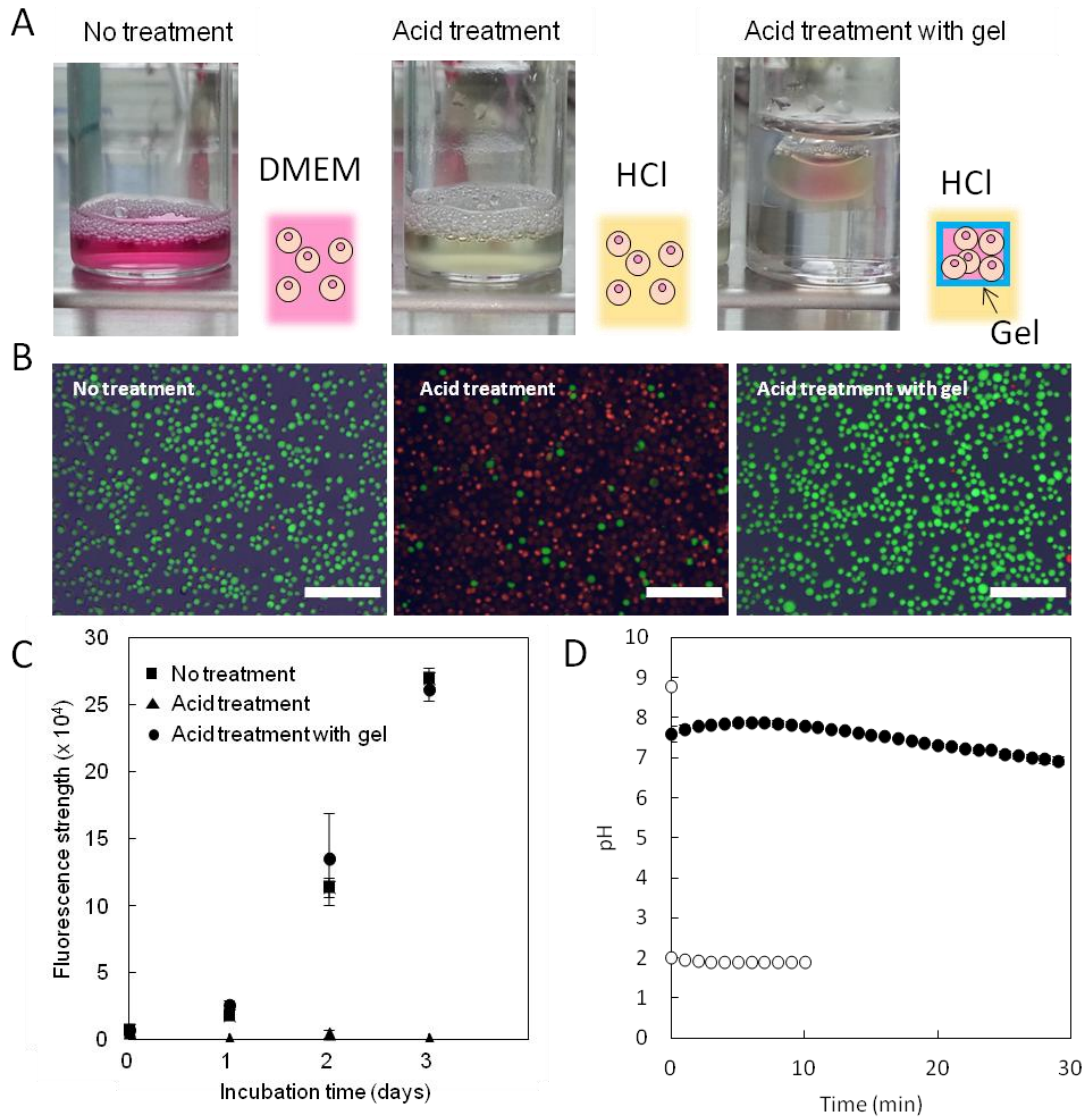


Figure 4-3. (A) Digital photographs of NIH 3T3 cells in DMEM, HCl (0.01 M) and in a gel box floating in HCl (0.01M). (B) Live and dead cell assay after each treatment (red; dead, green; alive)(scale bars = 200  $\mu\text{m}$ ). The encapsulated cells were collected and reseeded on TCPS dishes. (C) Alamar blue assay was used to assess the proliferation of the collected cells after each treatment. Data are presented as mean  $\pm$  DS (n = 2 per condition). (D) Time-dependent pH changes of the cell suspended HCl solution with (closed) and without (open) gel box.

さらに、今回の検討では、細胞に加えて、生物(アリ)を内部に内包させることもできた(Figure 4-4 A)。SHT をもちいて空気中で中空ゲルを作製することで、アリを水溶液に漬けることなく、ハイドロゲルを作製することができたためである。さらに、アリを内包したハイドロゲルを3分間ヘキサソに浸漬させたが、アリは生存していた。すなわち、ハイドロゲルの膜によって、アリが過酷な環境から守られたということである。アリの直接的な応用はないが、実際にハイドロゲルに生物を内包させることが可能であることを示す結果が得られた。また、ハイドロゲルの箱を一回り大きなハイドロゲルの箱で包み込むことも可能であった。ハイドロゲルの中空多層構造を作製することは極めて困難であり、複雑なプロセスを用いる必要がある。今までに多層型の閉じた系をハイドロゲル

で再現した研究例は著者の知る限り一例に限られており、形状も表面エネルギーの最小化に伴う一般的な球形から楕円形に近い形状であった。むしろ、これは作製プロセスが組み立てではなく、前駆体の集積という方法に頼っているためであり、換言すれば、任意の形状を研究者自らが選択し、それを多層に積層することは非常に困難であるということである。本研究でもちいた SHT 法では、任意の形状(今回の検討では立方体)で積層が可能であった。方法論としては非常に単純であるが、4.2.1.にて言及した方法を繰り返すことで理論上、任意の数の層に積層された箱型ゲルを作製することが可能であった。4.2.1.で使用した PET フィルムに加えて、この検討において一辺が 5 mm、そして 11 mm の立方体の展開図をそれぞれ PET フィルムで作成した。これに沿って裁断した SHT を小さなものから順番に組み立て、自己修復、紫外線照射の順に加工し、ハイドロゲルの箱を作製していった。一回り大きなゲルの箱を組み立てる際に、小さいゲルの箱を予め閉じ込めるようにして組み立てた。箱を組み立てるサイクルを三回行い、3 層の箱から構成されるマトリョシカ型のゲルを作製した。作製後のマトリョシカ型ゲルは、箱型ゲルと同様に水中に浮遊しており、また  $\text{VCl}_3$  由来の緑色の脱色に関しては、内層になるにしたがって時間がかかるということが明らかとなった。これは、単純な拡散によってイオンや 4-arm PEG-phos が抜けるという考察を支持する結果である。7 日間の浸漬後も、ゲルは水中に浮遊しており、初期形状の箱型ゲルを保っていた。浸漬後のマトリョシカ型ゲルを取り出し、半分に切断したところ、それぞれの層が独立して存在していた。可視化のためにそれぞれの層を中心から、青、赤に染色したところ、実際に小さい箱型のゲルがより大きなハイドロゲルの層にきれいに内包されていた。

以上のように、ハイドロゲルを箱型に成型することによって、新たな機能、すなわち保存能を発現することが明らかとなった。この箱型のハイドロゲルは、SHT によって容易に作製が可能となり、新たな細胞保存用のゲルデバイスの開発が期待される結果が得られた。

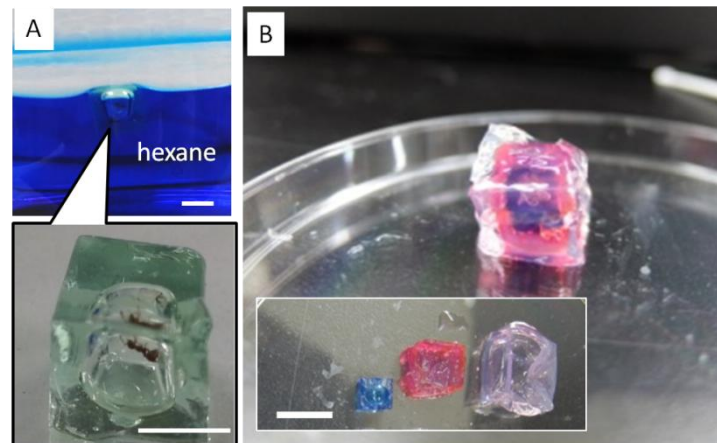


Figure 4-4. (A) An ant was encapsulated in the box. After 5 minutes, the ant was taken out of the box and found to be alive (bottom) (scale bar = 1 cm). (B) Photographs of the hydrogel boxes before and after nesting (scale bar = 1 cm). Each box was stained with blue (methylene blue) or red (methyl red) for clarity.

#### 4.3.3. キャピラリー状のアクチュエーターの性能評価

キャピラリー状のアクチュエーターは、SHT を用いることで比較的容易に作製ができた。作製の際に挿入したガラスキャピラリーは、架橋後容易に抜き去ることができ、その結果ハイドロゲルの内部に管径にして  $300\mu\text{m}$  のチャンネルを残すことに成功した。内部のチャンネルは、目視によっても確認できた。また、PNHA が貫入した SHT によって構築された部分は、 $40^\circ\text{C}$  に加温すると、

温度に応答して収縮する挙動が観察された。むしろこれは、その部分を構築するポリマーの主成分が NIPAAm 由来のものであることに起因する。温度による収縮挙動を観察したところ、チャンネル部分は時間依存的に収縮するということが明らかとなった(Figure 4-5)。3 章で述べた PNHA 含有の SHT から架橋したハイドロゲルの温度応答性と比較すると、温度応答性がそれほど鋭敏ではなく、むしろゆっくりとした温度応答を示した。この考察に関しては、PEGDA のゲルと接着されていることによって、PNHA 部分の形状変形が制限されたという点と、自己修復の段階で SHT に貫入している PEGDA と PNHA が混合してしまったことで、ゲルの温度応答が PEGDA によって抑制されてしまったという点が、根本的な理由であると考えられる。一点目の PEGDA ゲルとの接着によるゲルの変形抑制に関しては、PEGDA ゲルと PNHA ゲルの間で生じる膨潤ミスマッチを考慮する必要がある。すなわち、PNHA ゲル層が収縮し、一方で PEGDA ゲルに関しては温度応答を示さないため、二つのゲル部分で内部応力がかかることになる。このように、膨潤ミスマッチが生じる際に、そのミスマッチを抑制する方向へ大きな内部応力が生じることを考えると、温度応答によるハイドロゲルの収縮が穏やかであったことも理解できる。一方で、ポリマーの界面間の移動が、ゲルの成分に変化をもたらしたという考察は、3 章にて行った FITC デキストランの移動度からも把握できる通り、1 時間の自己修復においてもわずか 2 mm 程度の移動が観察されたのみである。よって、PEGDA ゲルとの接着によって温度応答が抑制されたことで、PNHA ゲルのチャンネルの内径の収縮に時間がかかったと考えられる。そこで、PNHA を主成分とした箇所を切り出し、断面を顕微鏡で観察した。同様にゲルを 40°C に加温し、温度応答を確認したところ、迅速な応答を示した。観察方向を変えることで応答挙動が異なるという点は興味深い。これは、ゲルが柔らかいため、側面から観察すると、内部のチャンネルが自重によってつぶれてしまっているためであるとも考えられる。一方で、PEGDA との接着から解放されたことによってゲルの駆動が速やかに起こったとも考えられる。このような複合的な理由から、PNHA ゲルの温度応答性が向上したということが推察された。温度駆動の速度に関する改善点は残るものの、結果としては、例えば熱刺激によって駆動するバルブやポンプなどの新たな応用に対して期待が持てるゲルの開発に成功した。

今まで並行平板状が当たり前とされていたアクチュエーターであるが、今回の検討によって、その形状以外にも、様々な形状にてアクチュエーターが作製できることが明らかとなった。SHT 法の発展によって新たな形状を有するハイドロゲルが開発され、その形状がキーファクターとなって機能化されたソフトアクチュエーターを開発する可能性が広がったといっても過言ではない。

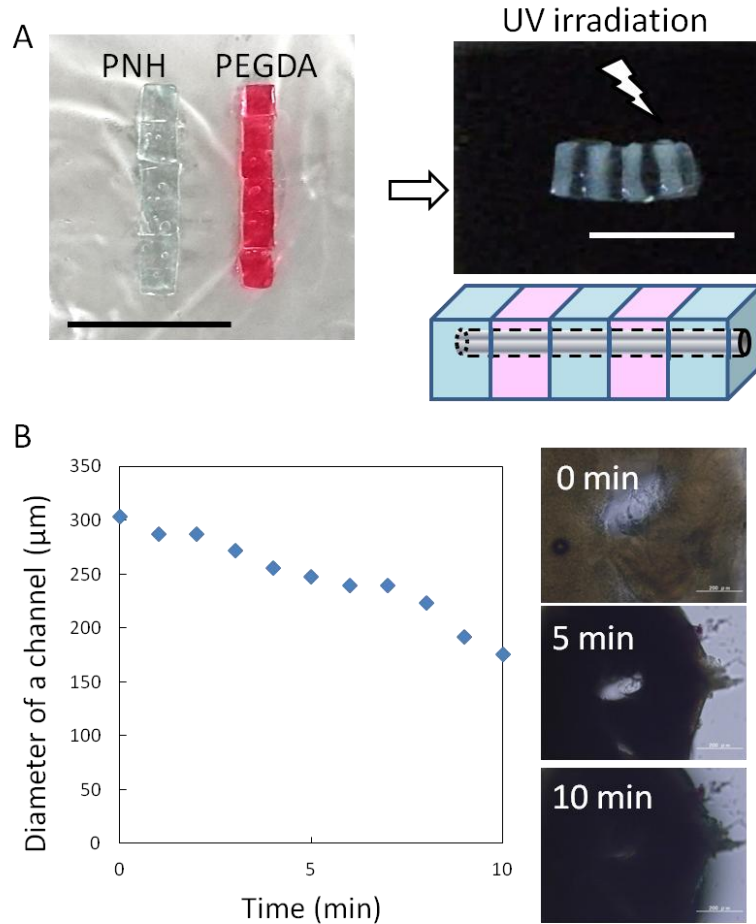


Figure 4-5. (a) Preparation of binary hydrogels with microchannel structure using PNH and PEGDA (Scale bars = 1 cm). (b) Time-dependent change of the microchannel diameter in the PNH gel in response to temperature change from 25 to 40°C. (c) Optical microscope images of the cross-section of the microchannel in PNH gel in response to temperature change from 25 to 40°C.

#### 4.4. 結論

SHT を用いて、今までに前例がないハイドロゲルデバイスの開発に成功した。中空の箱型ゲルは、例えば細胞を過酷な環境から隔離し、細胞が健全な状態で存在できる場を提供することができ、例えば箱型ゲルの内部に細胞を担持させ、目的の部分に送達させることもできる。加えて、例えば生物をゲルの内部に取り込むことができようになり、薬剤、細胞、生物を担持し、薬物放出担体や、生物を保存するための容器としての展開が期待される結果を得た。

刺激応答性高分子(PNHA)を貫入させた SHT は、3 章での検証と同様に、温度によって収縮するということが分かった。PNHA と PEGDA を組み合わせたハイドロゲルは、アクチュエーターとしての機能として、例えばポンプやバルブなどの応用が可能であると考えられ、今後、形状を変えることで様々な機能をアクチュエーターに対して付与できると考えられる。



#### 4.5. 参考文献

1. Sato, T.; Ebara, M., Fabrication of Temperature-responsive Hydrogels with Arbitrary Geometries by Using Self-healing Template. *Chemistry Letters* **2016**, *45* (12), 1394-1396.
2. Sato, T.; Uto, K.; Aoyagi, T.; Ebara, M., An Intriguing Method for Fabricating Arbitrarily Shaped “Matreshka” Hydrogels Using a Self-Healing Template. *Materials* **2016**, *9* (11), 864.
3. Muroi, H.; Hidema, R.; Gong, J.; Furukawa, H., Development of Optical 3D Gel Printer for Fabricating Free-Form Soft & Wet Industrial Materials and Evaluation of Printed Double-Network Gels. *Journal of Solid Mechanics and Materials Engineering* **2013**, *7* (2), 6.
4. Uhrich, K. E.; Cannizzaro, S. M.; Langer, R. S.; Shakesheff, K. M., Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chemical Reviews* **1999**, *99* (11), 3181-3198.
5. Lin, C. C.; Metters, A. T., Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Adv Drug Deliv Rev* **2006**, *58* (12-13), 30.
6. Nguyen, K. T.; West, J. L., Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* **2002**, *23*, 8.
7. Weber, L. M.; He, J.; Bradley, B.; Haskins, K.; Anseth, K. S., PEG-based hydrogels as an in vitro encapsulation platform for testing controlled beta-cell microenvironments. *Acta Biomater* **2006**, *2* (1), 1-8.
8. Osada, Y.; Okuzaki, H.; Hori, H., A polymer gel with electrically driven motility. *Nature* **1992**, *355*, 3.
9. Maeda, S.; Hara, Y.; Sakai, T.; Yoshida, R.; Hashimoto, S., Self-Walking Gel. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 5.
10. Yoshida, R.; Takahashi, T.; Yamaguchi, T.; Ichijo, H., Self-Oscillating Gel. *Journal of American Chemical Society* **1996**, *118*, 2.
11. Yoshida, R., Design of Self-Oscillating Gels and Application to Biomimetic Actuators. *Sensors* **2010**, *10*, 13.
12. Ionov, L., Hydrogel-based actuators: possibilities and limitations. *Materials Today* **2014**, *17* (10), 494-503.
13. Techawanitchai, P.; Ebara, M.; Idota, N.; Asoh, T.-A.; Kikuchi, A.; Aoyagi, T., Photo-switchable control of pH-responsive actuators via pH jump reaction. *Soft Matter* **2012**, *8* (10), 2844.

## 第5章

### 自己修復テンプレート法の生体親和性を向上させるための検討

## 5.1 緒言

第3章、第4章において、4 arm PEG-phos と金属イオンから成る自己修復ゲルをテンプレートとして使用してきた。最終的な応用目的として生体応用を目指すにあたり、生体適合性の向上は急務であると考えた。使用する金属イオンによるが、基本的には重金属イオンを使用した場合、生体に対して毒性を示す場合が多い。例えば、鉄は人体にとって必須元素のひとつであり、生体に対して比較的親和性があると考えられるが、自己修復ゲルを構築する架橋剤として鉄イオンを使用した場合は、生体に対して鉄過剰症という症状が発症する可能性がある。また、その他重金属イオンを体内に注入した場合は、水俣病などに代表される中枢神経のマヒなどの重篤な症状を引き起こす可能性すらある。よって、どのような金属イオンを使用する場合でも、使用は避けるべきである。金属イオン不使用の自己修復ゲルの合成手段の一つとして、フェニルボロン酸(phenyl boronic acid: PBA) とジオールの間の結合に着目した。PBA は pH = 8 以上において糖が持つジオールと特異的に結合するということが報告されている。この結合は、有機金属錯体の形成と同様に、動的に解離と再結合を繰り返すことが知られている。あくまでこれはグルコースなどの糖分子単体との相互作用の話であり、PBA と糖をそれぞれ高分子に修飾した場合の多点結合はハイドロゲルを構築するのに十分な結合力を有すると考えた。また、修飾対象となるポリマーにも優れた生体親和性が求められる。生体親和性を有する様々なポリマーが開発されているが、その中でもヒアルロン酸(hyaluronic acid: HA)は医療や化粧品の分野でよく用いられ、その優れた生体親和性も証明されている。5章の検討では、HA の側鎖に PBA とカテコール基をそれぞれ導入した HA-PBA と HA-CA を用いて自己修復ゲルの開発を目指した。

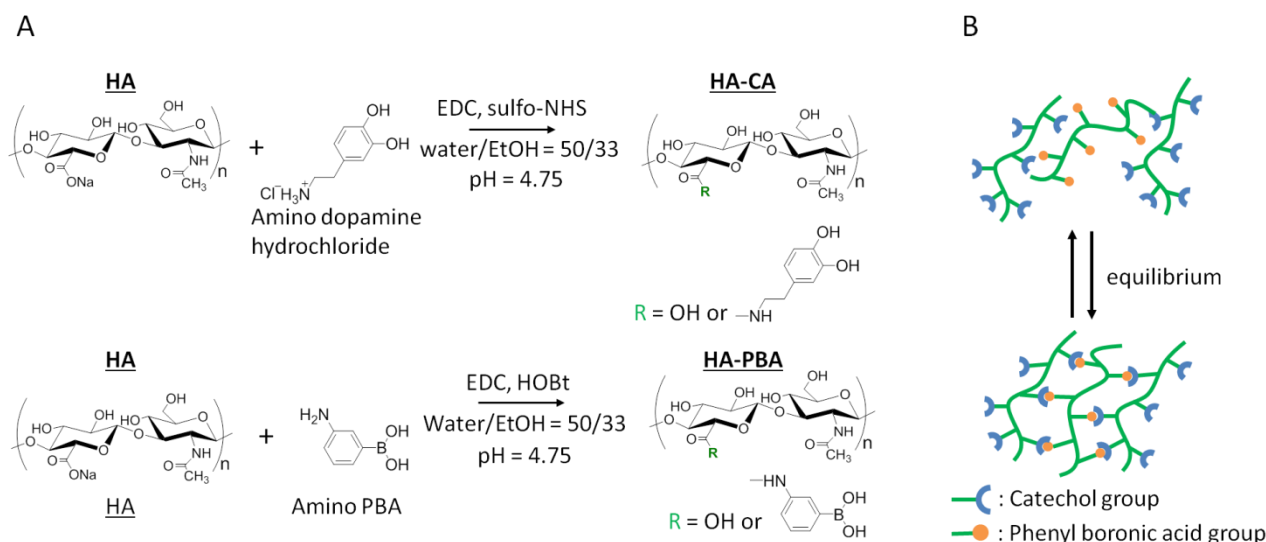


Figure 5-1. (A) Synthetic scheme of HA-CA and HA-PBA. (B) Schematic illustration of self-healing gel formation between HA-PBA and HA-CA.

### 5.1.1. ヒアルロン酸

ヒアルロン酸は、生体に多量に存在する生体高分子の一つである。生体内においては、関節、皮膚、脳、水晶体などの細胞外マトリックスに多くみられ、高い生体親和性を有することが知られている。主鎖骨格は N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸が連結した構造を一つのユニットとして有しており、大量の水を保持することができる。この優れた生体親和性と保水性を有することから、近年では化粧品や美容整形の分野において多く活用されている。研究の分野においても、幅広く応

用検討されており、細胞培養足場材料、インジェクタブルゲルなどへの応用が期待される研究が数多く報告されている。

### 5.1.2. PBA-diol 結合を利用した機能性ハイドロゲル

ボロン酸とジオール化合物の間で起こる相互作用は古くから報告されている。中でも、最も医療用のデバイス構築に対しての応用が進んでいるのが、PBA とジオール化合物、とりわけグルコースなどの生体に欠かせない糖分子との相互作用である。PBA は、フェニル機を有するボロン酸であり、pH に応答して、一般的に pH = 9 以上で負に帯電する。帯電状態の PBA とジオールが起こす可逆的な相互作用を用いて、グルコースに応答して薬を放出する DDS デバイスなどに応用されてきた。片岡らは NIPAAm と PBA 含有モノマーを共重合させることによって、レクチンなどの生体高分子を用いずに合成高分子のみでグルコース応答性ゲルを開発した。このグルコース応答性ゲルは、PBA の酸解離定数を超える pH において、グルコースと結合して膨潤するということが報告されている。このゲルは、例えば体内のグルコース濃度に応答してインスリンを放出する DDS デバイスとして応用が期待されている<sup>1</sup>。また、生体応用に対してネックであった酸性度の低さに関しても、松元らの研究によって解決されつつある。フェニル環上に強力な電子吸引基であるフルオロカーボンを導入した 4-(2 acrylamido ethylcarbamoyl) -3-fluorophenylboronic acid (AmECFPBA) は、生理活性条件におけるグルコースとの相互作用の獲得に成功しており、AmECFPBA と N-isopropylmethacrylamide を共重合させたハイドロゲルはインスリンポンプとしての応用が期待されている<sup>2</sup>。このように、ゲルネットワークを構築する分子鎖に存在する PBA に対してターゲットの分子が相互作用することによってハイドロゲルの膨潤-収縮の相転移が起こり、デバイスとして応用ができる。

一方で、PBA とジオール化合物の相互作用を架橋点として用いることで、ハイドロゲルを構築することも可能である。金野らは、リン脂質ポリマー(2-methacryloyl ethyl phosphorylcholine; MPC) に PBA を導入した poly(MPC-co-BMA-co-VPBA) と poly(vinyl alcohol) (PVA) をそれぞれ細胞培養液に溶解し、それら水溶液を混合することで、ハイドロゲルの合成に成功している<sup>3</sup>。このハイドロゲルは、グルコースなどのジオールの添加で容易に崩壊させることができ、セルコンテナなどへの応用が期待されている。さらに Tarus らはヒアルロン酸の側鎖に対して PBA とマルトースをそれぞれ導入し、HA-PBA と HA-maltose を合成した。これら高分子の水溶液を混合することで、生理活性条件下でのハイドロゲルの構築に成功している<sup>4</sup>。このゲルは、PBA とマルトースのジオール間の可逆的な結合により、自己修復特性を示し、それに伴うチキソ性も有していた。高い生体親和性を有するヒアルロン酸を主鎖骨格として持つ自己修復ゲルの作製例の一つであり、インジェクタブルゲルや細胞培養足場材料に対しての応用が期待されるゲルの好例である。PBA とジオール間の相互作用によっても自己修復ゲルの構築は可能であり、pH やグルコースに応答して相転移する性質から、注目を集めている。

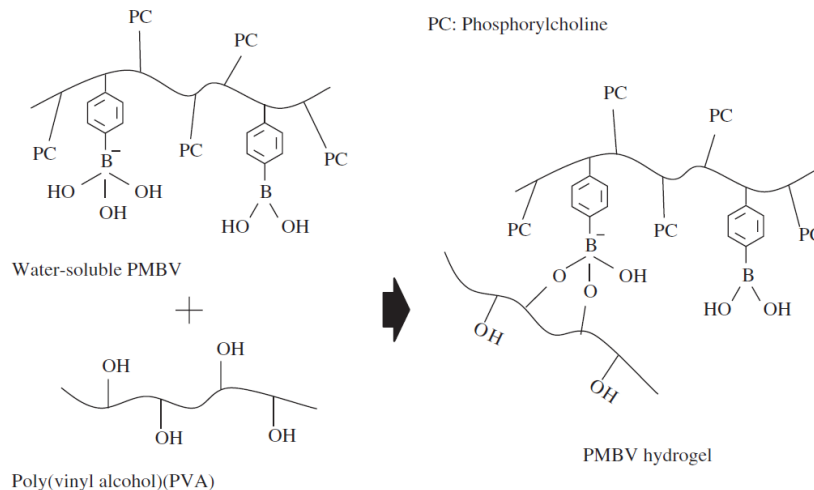


Figure 5-2. Schematic illustration of interaction between PBA and diol component.<sup>3</sup>

### 5.1.3. PBA と相互作用するジオール化合物

PBA は種々のジオール化合物と結合することが知られている。しかし、すべてのジオール化合物が必ずしも PBA と強く相互作用するわけではない。Springsteen らは、PBA と catechol をはじめとする種々のジオール化合物 21 種を pH = 7.4 において混合し、それぞれの結合定数を計算した。結果として PBA と catechol の組合せにおいて高い結合定数が確認された<sup>5</sup>。このように、結合力がジオール化合物の構造によって異なり、PBA 間での相互作用を駆使してハイドロゲルを機能化するためには、適切なジオール化合物を選択する必要がある。

## 5.2. 高分子の機能化に対する Catechol 基の役割

前節 5.1.3.において catechol 基と PBA の相互作用に関する基本的な性質を述べてきた。Catechol 基は、単にジオール化合物として PBA との可逆的な相互作用をするのみならず、金属イオンとも錯形成をし、動的な結合を作る<sup>6</sup>。この官能基は、ムラサキイガイの接着足糸の研究を皮切りに脚光を浴びるようになった。このムラサキイガイの接着足糸は、接着対象となる材料表面の性質によらず強力に接着し、さらに水中において接着が完遂するということが知られている。簡便な表現をすれば、「何にでも接着」し、「湿潤物質も接着」するということであり、人類が開発したどの接着剤よりも優れた性質を持っている。この足糸はムラサキイガイ特有のタンパク質から成り、Waite らの研究によって、L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) と Hydroxyproline を主成分とすることが明らかとなった<sup>7</sup>。さらに詳細な研究によって L-DOPA が接着に大きく寄与していることがわかり、L-DOPA が有する catechol 基を高分子に導入する研究が盛んにおこなわれるようになった<sup>8-12</sup>。

### 5.2.1. Catechol 基の酸化に伴う超分子形成

5.2.に示したように、イガイの足糸接着に対して L-DOPA が寄与していることが示唆される研究報告がなされているが、L-DOPA の酸化によって多量体を形成することによって、足糸が形成されるという報告がなされている。L-DOPA は酸化によって、catechol の脱プロトンが起こり、L-DOPAquinone になる。これはメラニンの前駆体として知られており、容易に二量体から多量体に結合する。Catechol の酸化による多量体形成に関しては、さまざまな経路をたどることが UV-vis や NMR による詳細な解析によって明らかとされているが、いずれの経路を経ても多量体を構築する。高分子の側鎖もしくは末端に L-DOPA が導入されている場合は、高分子鎖間での結合が起こる

ため、酸化によってハイドロゲル、または膜状の物質が構築される。イガイの場合では、コラーゲンを主鎖骨格として L-DOPA が導入された高分子が結合することによって足糸が形成される。

B. P. Lee らは四分岐末端の PEG の末端に L-DOPA を導入し、酸化剤( $\text{NaIO}_4$ )を加えることで末端の L-DOPA を化学架橋し、ムラサキイガイの足糸の形成プロセスを模倣してハイドロゲルを合成した。Shin らはヒアルロン酸の側鎖に L-DOPA を導入し、同様に  $\text{NaIO}_4$  を酸化剤として加え、ハイドロゲルを開発した<sup>13</sup>。いずれのハイドロゲルも優れた生体適合性を有することから、インジェクタブルゲルへの応用が期待されている。このように、L-DOPA を末端、または側鎖に有する高分子は酸化という単純な刺激に応答してハイドロゲルを形成することが可能である。また、用いられる酸化剤に関しても  $\text{NaIO}_4$  のみならず、mushroom tyrosinase に代表される酵素が用いられるようになり、さらなる生体適合性の向上が期待される架橋様式である。

### 5.2.2. L-DOPA と特定のイオン、官能基との相互作用の応用

L-DOPA は金属イオン、もしくは PBA などボロン酸に対しての相互作用がある。四分岐 PEG の末端に L-DOPA を導入した PEG は、 $\text{Fe}^{3+}$  に反応して自己修復ゲルを形成することが報告されている<sup>6</sup>。また、カルボキシ基と L-dopa との静電相互作用に着目した研究も報告されている。Prapatsorn らは NIPAAm と CIPAAm を共重合させたハイドロゲルに対して L-DOPA を静電的に結合させ、pH によって L-DOPA の着脱をコントロールすることに成功した<sup>14</sup>。ゲルに含まれる photo-acid generator (PAG) に対して紫外線を照射することによってプロトンが放出され、CIPAAm のカルボキシ基がプロトン化によって電荷を失う。したがって静電的に結合していた L-DOPA (パーキンソン病治療に有用なドーパミンの前駆体としても知られる) がゲルから放出される。このように、L-DOPA と特定のイオンもしくは官能基の間で相互作用をさせた後に pH 変化など、外部環境の変化を加えることによってそれらの着脱をコントロールすることができるため、インジェクタブルゲルや DDS 担体への応用が期待される。

## 5.3. 実験

### 5.3.1. 実験概要

生体高分子として知られるヒアルロン酸の側鎖に PBA と Amino-dopamine をそれぞれ導入したヒアルロン酸誘導体 HA-PBA と HA-CA を合成した。HA-PBA と HA-CA それぞれの PBS 水溶液を混合し、ハイドロゲルを合成した。詳細な動的粘弾性測定によってハイドロゲルの力学的な強度と修復挙動を観察した。さらに、pH = 7.4、37°C における HA-CA の PBS 水溶液の力学強度を同様に動的粘弾性測定によって詳細に測定し、継時的な力学強度の変化を観察した。また、色素増感剤として、eosin Y を HA-CA PBS 水溶液に添加し、緑色光の照射によるマイルドな条件での光架橋を試みた。ヒアルロン酸の側鎖の catechol-PBA の相互作用によるハイドロゲル形成と、HA-CA の側鎖の catechol 基の酸化による架橋のそれぞれを評価し、新たなハイドロゲル開発方法の構築と SHT の生体適合性向上を目指した。

### 5.3.2. ヒアルロン酸誘導体の合成

#### 5.3.2.1. HA-CA の合成

ヒアルロン酸に超純水を加え 4°C において静かに終夜攪拌し、完全に溶解させた。ヒアルロン酸水溶液を攪拌させながらエタノールをゆっくりと加えた。このとき、水とエタノールが体積比にして 50:30 になるように混合し、溶媒が完全に混ざり合うまで攪拌した。NaCl、sulfo-NHS、amino-dopamine、EDC をこの順番で加えた。それぞれの試薬は HA 溶液と速やかに混ざるように、あらかじめ少量の超純水で溶解しておいた。EDC を加えた後、0.1M 塩酸を用いて溶液の pH を 4.75

に固定し 3 時間反応させた。反応後、溶液を限外濾過によって精製し、凍結乾燥をした後回収した。サンプルは 4°C にて保存した。

### 5.3.2.2. HA-PBA の合成

ヒアルロン酸に超純水を加え 4°C において静かに終夜攪拌し、完全に溶解させた。ヒアルロン酸水溶液を攪拌させながらエタノールをゆっくりと加えた。このとき、水とエタノールが体積比にして 50:30 になるように混合し、溶媒が完全に混ざり合うまで攪拌した。NaCl、amino-phenylboronic acid、HOBt をこの順番で加えた。それぞれの試薬は HA 溶液と速やかに混ざるように、あらかじめ少量の超純水で溶解しておいた。HOBt を加えた後、0.1M 塩酸を用いて溶液の pH を 4.75 に固定し 3 時間反応させた。反応後、溶液を限外濾過によって精製し、凍結乾燥をした後回収した。サンプルは 4°C にて保存した。

### 5.3.2. ヒアルロン酸誘導体の構造同定

合成した HA-CA と HA-PBA をそれぞれ <sup>1</sup>H-NMR 測定した。重溶媒に D<sub>2</sub>O を用い、80°C において 32 回の積算をおこない、サンプルのピークを得た。

### 5.3.3. ヒアルロン酸を骨格とする自己修復ゲルの合成

HA-PBA と HA-CA を HEPES 緩衝溶液(pH = 7.4)に溶解させ、それぞれ 15 g/L の濃度に調整した。あらかじめ <sup>1</sup>H-NMR から算出した導入率から、PBA と catechol が分子量論比 1:1 になるように HA-PBA 水溶液と HA-CA 水溶液を混ぜ合わせた。それぞれの水溶液を混ぜ合わせる際、ボルテックスを用いて激しく振とうさせ、溶液を均一に混ぜ合わせた。

### 5.3.4. ゲルの動的粘弾性測定；修復挙動観察

前項 5.3.3.において作製したハイドロゲルの力学強度を動的粘弾性測定によって評価した。測定治具にコーンプレート(角度 4°, 直径 20 mm)を用いて測定をした。所定時間ごとにゲルに印加する剪断応力を 0.1 Pa から 600 Pa に、600 Pa から 0.1 Pa に昇降させてハイドロゲルの力学強度の変化を観察した。測定温度は 37°C に設定し、ハイドロゲルからの水の蒸発を防ぐためにカバーで覆った。

### 5.3.5. ゲルの動的粘弾性測定；時間経過による HA-CA のゲル化挙動の観察

HA-CA を超純水に溶解させ、30 g/L の濃度で調整した。HA-CA 水溶液と同体積の PBS 緩衝溶液(2倍に濃縮したもの)を粘弾性測定の直前に混ぜ合わせ、速やかに測定装置のステージ上に置いた。5.3.4.で用いたものと同じプレートを用いて HA-CA 溶液を挟み、余分な溶液をピペッターで取り除いた。HA-CA 溶液からの水分の蒸発を防ぐためにシリコンオイルで空気と触れる面をすべて覆った状態で HA-CA の時間経過における力学強度の変化を観察した。印加ひずみを 15%、周波数を 0.1 Hz に設定し、48 h 測定を継続した。

### 5.3.6. HA-CA 側鎖の catechol 基の二量体形成の測定

HA-CA を超純水に溶かし、30 g/L の濃度に調整した後、等量の PBS 緩衝溶液(pH = 6, 7.4, 8)を混合し 15 g/L の水溶液を作製した。この溶液を 37°C にて 12 h 静置した後、pH = 6 に調整した hyaluronidase/PBS 緩衝溶液 (400 unit/mL)を 1 mL 加えて窒素雰囲気化で 24 時間、37°C にて静置した。hyaluronidase で分解した HA-CA 溶液の 200 nm から 800 nm の範囲における吸光度を紫外可視分光計で測定した。

### 5.3.7. HA-CA 水溶液の可視光による光架橋

HA-CA を超純水に溶かし、30 g/L の水溶液を調整し、これと等量の eosin Y PBS 水溶液 (200  $\mu\text{M}$ ; pH = 7.4) を遮光条件にて混ぜ合わせた。この混合溶液に対して緑色光(波長 = 515 nm, 3 W)を 15 分間照射し、HA-CA 溶液の状態を確認した。

### 5.3.7. 光架橋後の HA-CA ゲルの力学強度評価

動的粘弾性測定装置のステージ上に円形のガラススライド(直径: 20 mm)を両面テープで固定し、その上にテフロン製のリング(内径: 18 mm)を固定した。このリング内に前項 5.3.7.にて取り扱った溶液を流し込み、溶液の液面から 10 mm の距離から緑色光を照射した。系全体における eosin Y の濃度を 100 $\mu\text{M}$  に固定し、緑色光を 0, 5, 10, 15, 25, 40 分間照射してゲル化させたゲルおよび、光照射時間を 25 分に固定した状態で eosin Y の濃度を 60, 100, 120 $\mu\text{M}$  に変化させて作製したそれぞれのゲルの力学強度を周波数変化測定によって観察した。測定治具には並行平板プレート(直径 18 mm)を用い、印加するひずみを 8% に固定した。温度を 37 $^{\circ}\text{C}$  に固定し、水分の蒸発を防ぐためシリコンオイルでゲルの側面を覆った後、周波数は 10 Hz から 0.01Hz まで減衰させた時のゲルの力学強度を観察した。

### 5.3.8. HA-CA ゲルの組織接着の評価

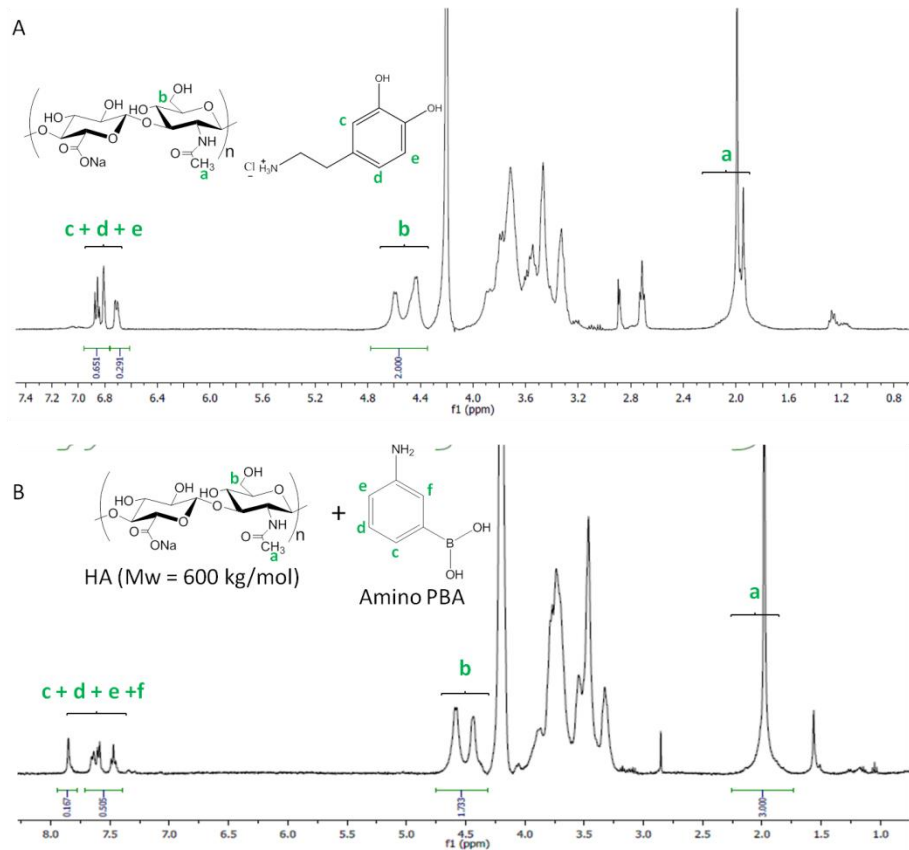
PBS (pH = 7.4) に溶解させた HA-CA 溶液(15 g/L)をブタの表皮の真皮側に塗布し、上からも一枚のブタの表皮真皮側を下にして乗せ、密着させた。プラスチックケースに入れ、37 $^{\circ}\text{C}$  で 3 時間静置した。この時、乾燥を防ぐためアクリル酸のゲルビーズをブタの組織に触れないように加えた。3 時間後、張り合わせたブタの組織の接着強度を引張試験によって評価した。

## 5.4. 結果と考察

### 5.4.1. ヒアルロン酸誘導体の構造同定

$^1\text{H-NMR}$  による測定の結果、Figure 5-3 に示すようなスペクトルを得た。それぞれ  $\delta = 2, 4.5$  ppm 付近にはそれぞれヒアルロン酸を構成する一方の糖である *N*-アセチルグルコサミンが有するアセチル基およびメチレン基のプロトン由来のピークが観察され、 $\delta = 7\sim 8$  ppm 付近において dopamine および PBA が有するフェニル基を持つプロトン由来のピークが観察された。それぞれのピークの積分値から、ヒアルロン酸の側鎖に対して dopamine および PBA の導入率を算出した。結果として、HA-CA の導入率は 30%、HA-PBA の導入率は 17% であった。この導入率は、既往研究の報告例を見る限りでは、比較的高い導入率を示しており、これによってゲルデバイスを作製した際には高強度が見込まれる結果が得られた。



Figure 5-3.  $^1\text{H-NMR}$  spectra of (A) HA-CA and (B) HA-BPA

#### 5.4.2. HA-PBA/HA-CA から成る自己修復ゲルの力学強度測定

HA-PBA と HA-CA をそれぞれ pH = 7.4 に調整した HEPES 緩衝液に溶解し、これら二つの水溶液を混ぜ合わせることで、迅速なゲル化が観察された。このことから、Figure 5-1 B に示すような動的結合が HA-PBA と HA-CA の間で起こっているということが示唆された。また、得られたゲルの力学特性と自己修復特性を観察するために、動的粘弾性測定装置を用いた測定を行った。非破壊時のハイドロゲルの強度測定を 0.1 Pa 印加条件で、破壊時のゲルの強度測定を 600 Pa 印加条件でそれぞれ測定した。測定の結果、HA-PBA/HA-CA ゲルは 100 Pa 程度の貯蔵弾性率を有していることが明らかとなった。また応力印加を 600 Pa まで増大させることで、ゲルは一時的にその貯蔵弾性率を低下させ、流動状態になることが示された。しかしながら、応力印加を 0.1 Pa まで緩和することで、初期状態にまで力学特性が回復するということが Figure 5-4 から見て取れる。これは HA-PBA/HA-CA ゲルが高い自己修復性を示していることを強く示唆するデータである。この結果から、高い生体適合性を有する自己修復ハイドロゲルの構築に成功したことが明らかとなり、今後の SHT 法を利用したハイドロゲルの作製が、さらに幅広く応用展開できることが期待される。

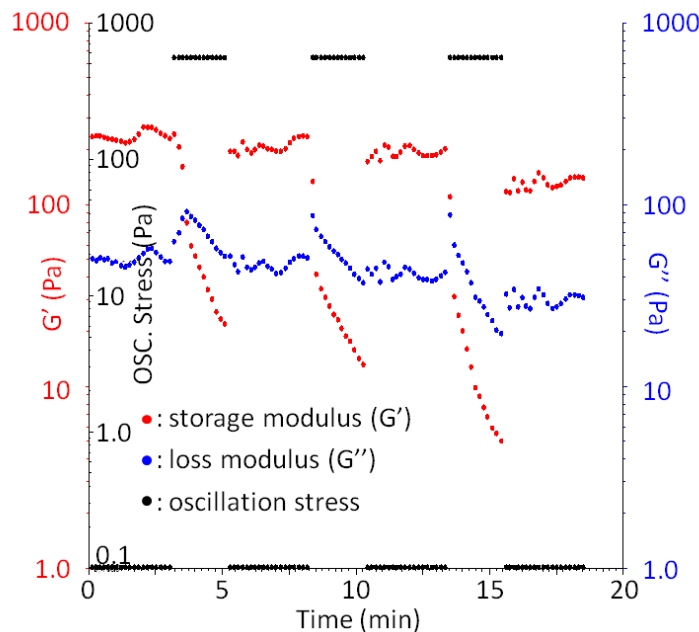


Figure 5-4. Share stress sweep test on the self-healing hydrogel at 25°C. (red symbol, blue symbol and black symbol shows storage modulus, loss modulus and share stress which was induced into hydrogel respectively)

#### 5.4.3. 酸化によって起こる HA-CA の架橋挙動の測定

HA-CA を大気中に静置しておくこと、分子量や導入率によるが、少なくとも 12 h 以内に架橋が観察された。これは Figure 5-5 に示すように Catechol 基が大気中に静置しておくことで容易に酸化され、二量体以上の多量体を形成して HA 鎖が架橋されるためであると考えられる<sup>15</sup>。この酸化は自然酸化であり、catechol 基が有する二つの水酸基が容易に脱プロトン化することに起因すると考えられる。自然酸化の一連の経路は種々の研究によって明らかとなっているが、Figure 5-6 に示すような経路で酸化が起こるといことが知られている。この自然酸化は catechol 基が一つの電子を放出し、*o*-semiquinone ラジカルを形成することから始まる。この酸化プロセスにおいて、活性酸素の一種であるスーパーオキシドアニオンラジカル( $O_2^{\cdot-}$ )の産生が起こるとい報告がされている<sup>15</sup>。産生された  $O_2^{\cdot-}$  は未酸化のカテコール基と反応し、*o*-semiquinone ラジカルと過酸化水素を産生する。*o*-semiquinone ラジカルは不安定であるため、速やかに減衰し、*o*-quinone と catechol になる<sup>16</sup>。さらに、その他の反応経路として、二つの *o*-semiquinone ラジカルが直接的に反応して aryl 基での共有結合が起こるとい報告もされている<sup>17</sup>。

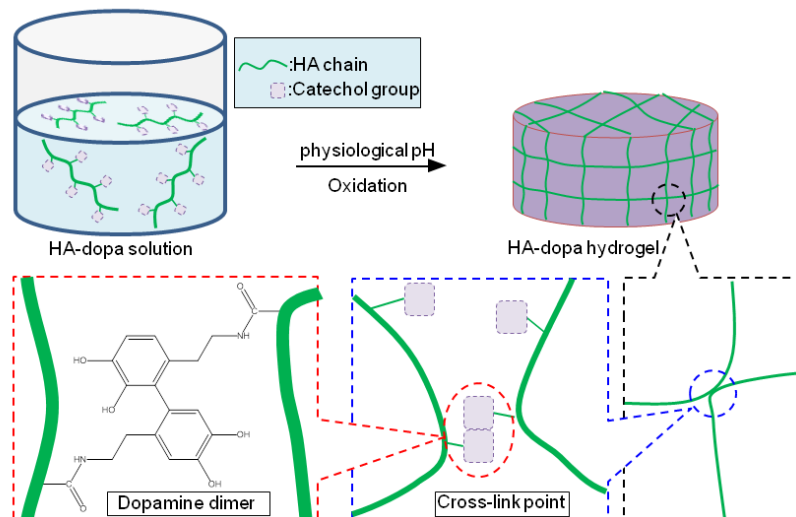


Figure 5-5. Synthesis of HA-based hydrogels in physiological conditions via the oxidative coupling of catechol moieties grafted on HA.

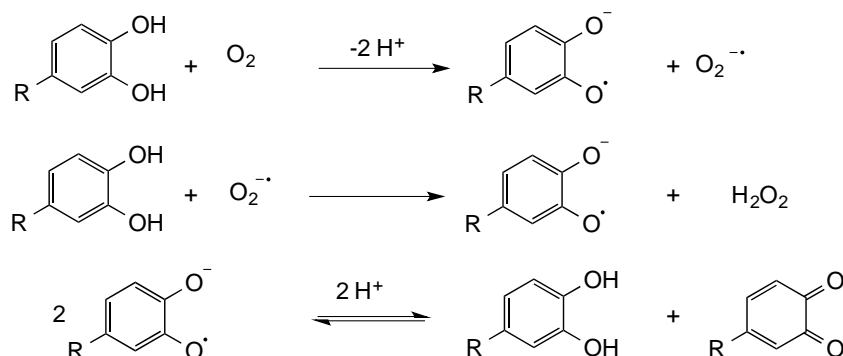


Figure 5-6. Reaction scheme of the auto-oxidation of catechol to *o*-quinone.<sup>15</sup>

この反応から分かる通り、HA-CA 末端の catechol 基は酸化に伴い多量体を形成し、それに伴う架橋が起こるため、事実上、水溶液を大気中に保持しておくだけで、酸化剤やそれ以外の助剤、刺激などを加えずとも架橋できるということが示唆された。分子量 500 kDa の HA-CA 水溶液を pH = 7.4 の PBS 中に溶かした溶液は、空気中に 2 時間 30 分保持しておくだけで目視でゲル化が確認できた。ゲル化に伴い、溶液が変色するという挙動が観察され、無色透明の溶液がその粘性を上げながら淡紫色へと変色し、架橋が完遂するころには褐色に変化することが明らかとなった。一方で分子量 200 kDa の HA-CA を PBS (pH = 7.4) に溶かした溶液は同じ 2 時間 30 分の酸化では架橋せず、粘ちょう溶液になるにとどまった。また、このゲル化の挙動を動的粘弾性測定によって測定したところ、Figure 5-7. A に示すように、目視で確認した時と同様の時間において  $G'$  と  $G''$  の交差が起こることが明らかとなった。本検討においては、 $G'$  が  $G''$  を上回る際に、すなわち貯蔵弾性率(弾性項)が損失弾性率(粘性項)よりも優勢となった際に、HA-CA 溶液がゲルとなったというように定めた。むろん、この  $G'$ ,  $G''$  の値に関しては、印加する周波数に依存して変化するが<sup>18-19</sup>、それぞれの溶液のゲル化速度( $t_{\text{gel}}$  と定義)を求めるために、この点を用いた。 $t_{\text{gel}}$  を超えてからのゲルの力学的強度の上昇がが頭打ちになるまでの時間を求めるために、継続して動的粘弾性測定を行ったものの、48

時間を超えてもゲルの強度上昇が観察された。そのため、さまざまな条件で作製した HA-CA のゲルの力学強度を比較する際には、粘弾性測定実験の終了時点での強度、すなわちこの場合では 48 時間後のゲルの力学強度( $G'_{48h}$ )を用いた。また、分子量 500 kDa の HA-CA 溶液に関しては、所定時間(30 分、1 時間、2 時間、3 時間、12 時間)において周波数変化測定によって、その力学強度を測定した。周波数変化測定を行った結果、Figure 5-7 B に示されるようなグラフを得た。HA-CA はやはり 2 時間 30 分を境にゲル化しているということが明らかとなった。

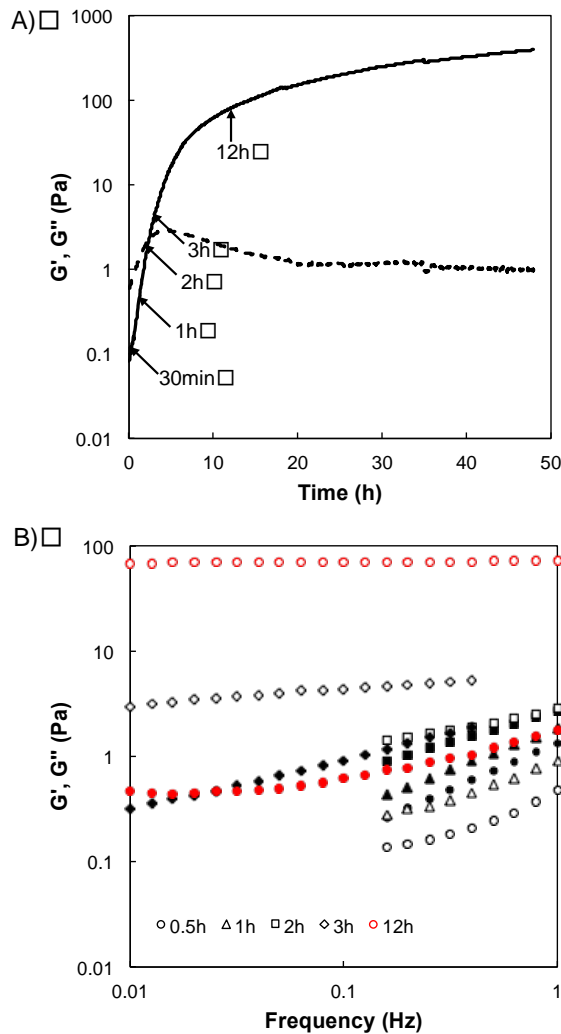


Figure 5-7. Dynamic rheological analysis of the gelation kinetics at 37 °C of HA500-CA (DS = 0.3) at a concentration of 15 g L<sup>-1</sup> in PBS (pH 7.4). A) Time dependence of storage ( $G'$ , straight line) and loss ( $G''$ , dotted line) moduli at a fixed frequency (1 Hz). B) Frequency dependence of storage and loss moduli at different time periods of gelation; open symbols:  $G'$  curves; closed symbols:  $G''$  curves.

#### 5.4.4. HA-CA の架橋における pH の影響

実験の過程で、自然酸化による HA-CA の架橋時間が、溶液の pH によって変化することが分かったため、溶液の pH を 6 から 8 に変えた条件で同様の観察を行った。Figure 5-8 に示すように、HA-CA の架橋に要する時間は、pH を増大させるにしたがって短くなることが分かった。具体的には、pH = 6, 7.4, 8 の溶液において  $t_{gel}$  はそれぞれ 20 時間 40 分、2 時間 30 分、48 分であった。この

現象は、pH 上昇に伴い、catechol 基が有する水酸基の脱プロトンが促進されたことに起因すると考えられる。すなわち、Figure 5-6 に示した反応の初期段階の反応が pH = 6 において起こりにくくなったため、catechol 基の結合が起こらなかったと推察される。また、溶液の pH 条件は 48 時間後の G' にも大きな影響を与えることが分かり、pH = 8 の溶液では 48 時間後に 965 Pa に達したのに対して、pH = 7.4、6 の溶液に関してはそれぞれ 395 Pa と 30 Pa という値であった。pH によってゲル化までの時間と最終的な強度に違いがみられたものの、生理活性条件における HA-CA の架橋挙動は照明された。この pH が架橋に与える影響は、UV-vis を用いた測定結果からも支持された。Figure 5-8. B に示すように、pH が 6 から 8 に増大するにしたがって、溶液の吸光度が全体的に強くなるということが明らかとなった。また、catechol 同士が結合した二量体が示す特有のピークが 500 nm 付近に観察されるが、pH 上昇に伴い、その領域の吸光度の強度上昇が観察された。そのほかの領域でも全体的に高 pH の溶液が高い吸光度を示しているが、これは catechol のが二量体のみならず、それ以上の多量体、すなわちメラニンを形成していることに起因する吸光度上昇であると推察される<sup>17, 20-21</sup>。これらのデータからは、HA-CA の側鎖の catechol がどれだけの割合で架橋に与っているのかは定量的に評価できないものの、実際に溶液を参加させた数時間のうちに catechol 基が二量体を形成し、HA-CA を架橋したということを強く示唆する結果が得られ、またその度合いが pH によって変化するという知見も得ることができた。

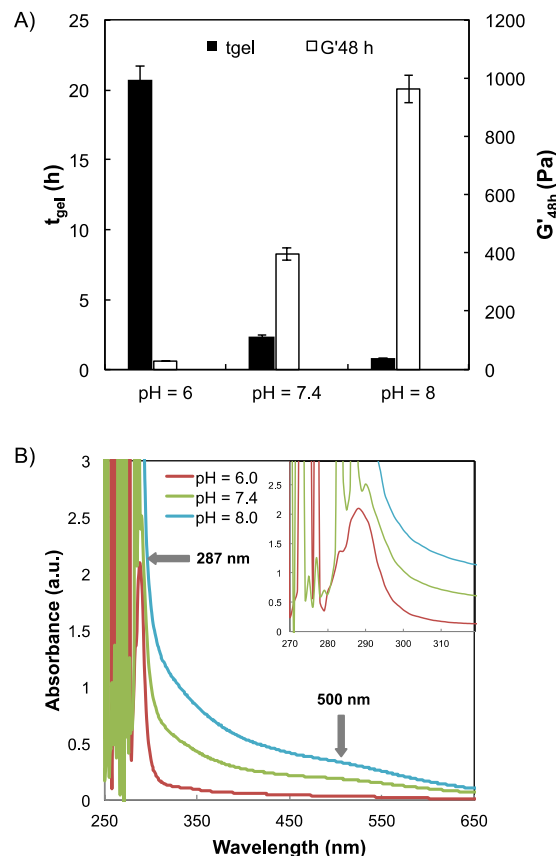


Figure 5-8. Influence of the pH on the gelling properties of solutions of HA500-CA at a concentration of  $15 \text{ g L}^{-1}$  in PBS. A) Comparison of the gelation time and the hydrogel elasticity ( $G'_{48h}$ ) derived from rheological time sweep experiments performed at  $37^\circ\text{C}$  and at pH 6, 7.4 and 8. B) UV-vis spectra for the oxidation of HA500-CA ( $15 \text{ g L}^{-1}$  in PBS) at  $37^\circ\text{C}$  and at pH 6, 7.4 and 8.

今までに高分子の末端、もしくは側鎖に catechol 基を導入した誘導体を生理活性に近い条件で架橋させることに成功したという報告はなされているが、house radish peroxidase, mushroom tyrosinase などの酵素や  $\text{NaIO}_4$  などの無機酸化剤の存在下で高分子溶液を酸化させていた<sup>21-23</sup>。 $\text{NaIO}_4$  の存在下において  $\text{pH} = 8$  に調整した溶液を架橋させており、生体に対して穏やかな条件であるとは言いきれない<sup>23</sup>。なお、 $\text{pH} = 8$  に調整した HA-CA 溶液に対して、側鎖の catechol 基と等モル量の  $\text{NaIO}_4$  を添加した場合、極めて迅速なゲル化が観察され、最終的な  $G'$  の値は、加えてない溶液に比べて 25 倍も高いという結果が得られた(Figure 5-9)。

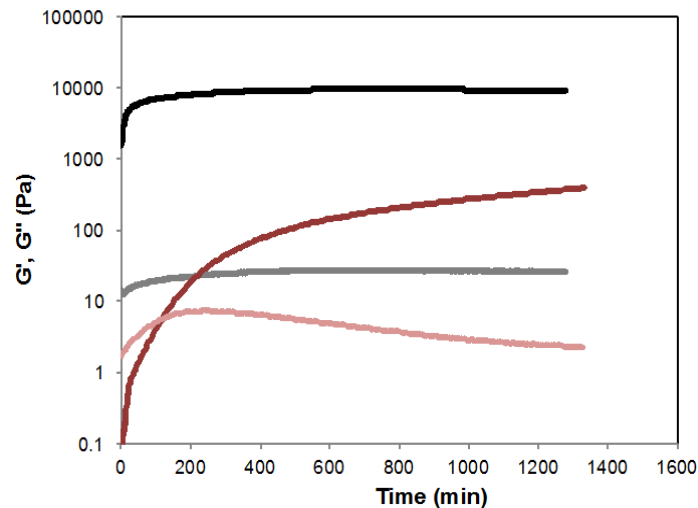


Figure 5-9. Time dependence of storage ( $G'$ ) and loss ( $G''$ ) moduli at a fixed frequency (1 Hz) and at 37 °C of HA500-CA (DS = 0.3) at a concentration of 20 g/L in PBS at pH 8 in the presence of  $\text{NaIO}_4$  ( $\text{NaIO}_4$ :catechol stoichiometric ratio is 1:1, —  $G'$ , —  $G''$ ) and in PBS at pH 8 (—  $G'$ , —  $G''$ ).

また、HA-CA のゲル化に対して、分子量、および導入率が与える影響についても考察した。分子量が 500 kDa と 200 kDa の二種類の HA-CA で、それぞれ導入率 30% のものを用意し、 $\text{pH} = 7.4$  の条件においてそれぞれの溶液  $t_{\text{gel}}$  を時間変化測定によって明らかとした。結果として、Figure 5-10 に示すように分子量の小さいものに関しては  $t_{\text{gel}}$  が延びる傾向が観察された。むしろこれは、分子量が大きくなるにしたがって、高分子鎖同士の絡み合いが増えることでゲルの架橋点となる箇所が増えたことが大きな要因と考えられる。さらに言及すれば、一般的な高分子において、分子量が大きくなるほど粘性が上がる傾向がある。これは、それぞれの分子鎖の排除体積が大きくなり、限られた系の中での分子同士の衝突、ジャミングによって引き起こされていると推察されるが、初期状態での粘度の高さも、ゲル化を促進する(粘弾性測定において、 $G'$  が  $G''$  よりも高く検出される)一因となっていると考えられる。一方、同一の分子量を持つ HA-CA の力学強度変化を測定したところ、導入率上昇に伴って  $t_{\text{gel}}$  が短くなる傾向が観察された。測定の結果から、高い分子量の HA-CA を用いて初期状態の粘度を上げることが、 $t_{\text{gel}}$  を短くすることに有利に働くことが明らかとなった。しかしながら、初期状態において粘度が高いことは必ずしも良いこととは限らず、インジェクタブルゲルとしての応用を考えた時には初期状態の粘度が低い方が有利である。一般的に注射で用いられる 25G であり、細く、高粘度の溶液を通すことができない<sup>24</sup>。さらに、 $\text{NaIO}_4$  との混合によって急速に架橋を進めてしまうと、いっそうインジェクタブルゲルとして使用することに向かなくなるのが予想される。さらに、分子量 200 kDa で、導入率 10% の HA-CA に対しても、 $\text{NaIO}_4$

の添加によって迅速に架橋が起こることが明らかとなっている (Figure 5-11)。このような理由から極力、酸化剤の使用を控えた状態で架橋を迅速に進める方法を考えた。

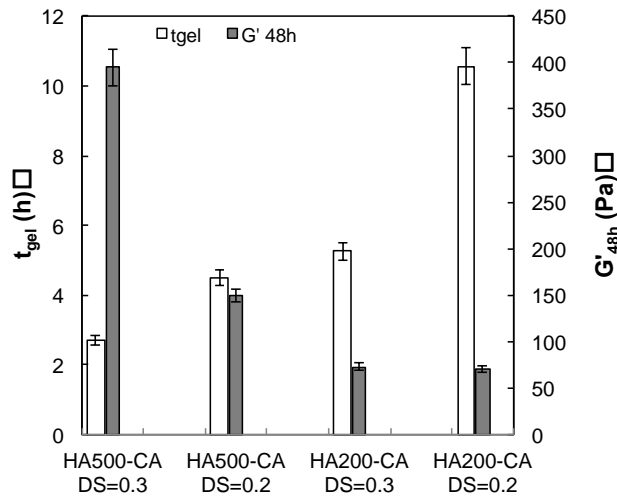


Figure 5-10. Comparison of the gelation time and the hydrogel elasticity ( $G'_{48h}$ ) derived from rheological time sweep experiments for solutions of HA500-CA and HA200-CA with different DS. The rheological analyses were performed at 37 °C from solutions at a concentration of 15 g L<sup>-1</sup> in PBS at pH 7.4.

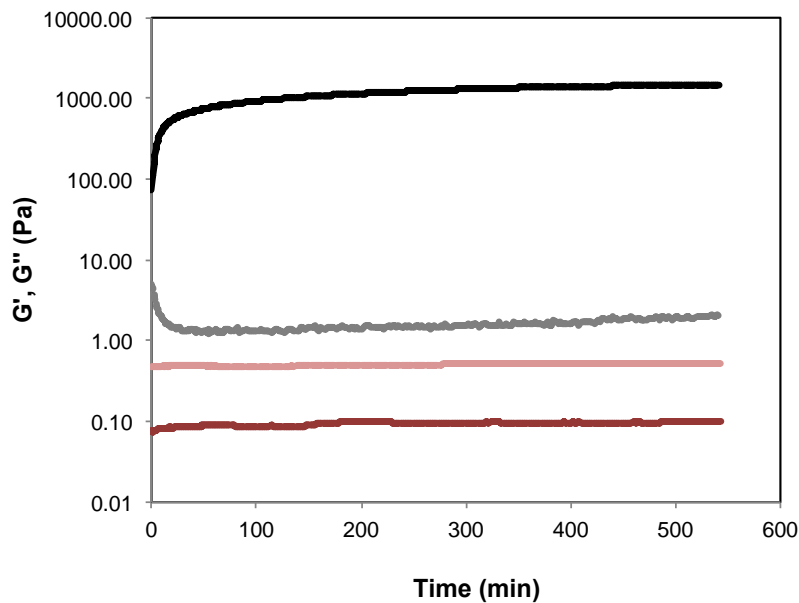


Figure 5-11. Time dependence of storage ( $G'$ ) and loss ( $G''$ ) moduli at a fixed frequency (1 Hz) and at 37 °C of HA200-CA (DS = 0.1) at a concentration of 20 g/L in PBS at pH 8 in the presence of  $NaIO_4$  ( $NaIO_4$ :catechol stoichiometry is 1:1, —  $G'$ , —  $G''$ ) and in PBS at pH 8 (—  $G'$ , —  $G''$ ).

## 5.4.5. 可視光を使用した HA-CA の光架橋

5.4.3.において HA-CA 溶液の酸化による架橋を詳細に検討したが、本項では新たに可視光によって HA-CA 溶液の架橋を促進することができた。緑色光( $\lambda = 515 \text{ nm}$ )を色素増感剤の存在下において照射することで、自然酸化と比較してはるかに迅速な架橋が可能となり、組織や細胞に対して有害になりうる紫外線を使用せず光架橋をすることが可能となった<sup>25</sup>。色素増感剤として eosin Y (EY) を  $100 \mu\text{M}$  加えた HA-CA 水溶液は、緑色の発光ダイオードの光を当てることで速やかにゲル化が起こることが明らかとなった。EY は  $510 \text{ nm}$  付近に大きな吸光領域を有しており、この波長域に近い光、すなわち緑色光を強く吸収する。光が当たると EY は励起されるが、分子内に存在するアントラセン構造によって容易に励起三重項状態(EY\*)に変換される<sup>26</sup>。この EY\*における電子状態は、phenol や catechol から電子を受容し、ラジカルアニオン状態(EY $\cdot^-$ )になる。一方で電子を供与したドナーは phenol ラジカルへと変換されるが、これは前述したように、phenol ラジカル同士が反応することで Aryl 基同士での共有結合を生じる。一方で、EY $\cdot^-$ は種々の経路をたどり基底状態に戻るとされている<sup>27</sup>。また、溶存酸素と反応して一重項酸素を発生させ、一重項酸素が種々の酸化経路に作用する可能性もある。これらの結果から、catechol が *o*-semiquinone ラジカルに変換され、結果として酸化による二量体の形成が促進されたと考えられる<sup>16</sup>。EY の存在下では、HA-CA は速やかに架橋が起こるということを動的粘弾性測定によって明らかとした。ゲルは測定装置のステージ上で溶液に緑色光を当てることで作製した(Figure 5-12)。

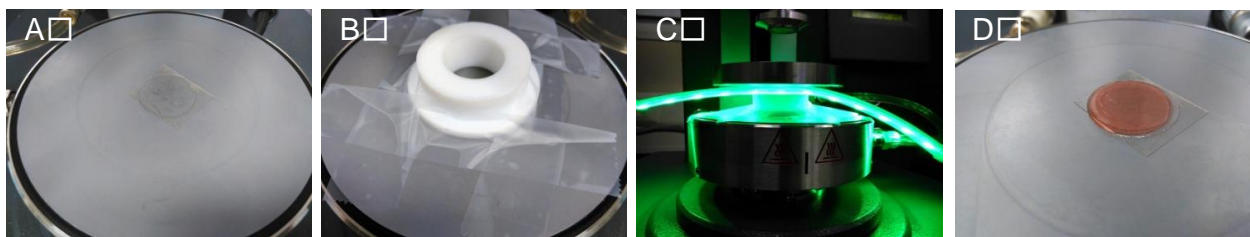


Figure 5-12. Method for the preparation of HA-CA hydrogels by green light-irradiation and their analysis by frequency sweep tests. A) A HA-CA-modified coverslip was fixed on the peltier plate with double surface tape. B) The HA500-CA solution in PBS ( $250 \mu\text{L}$ ) was deposited on the HA-CA-modified coverslip to which a teflon ring is fixed. C) The HA-CA solution is exposed to green light for a defined time period. D) A hydrogel disk with a controlled thickness (typically ranging from  $750$  to  $800 \mu\text{m}$ ) is formed and covalently linked on the coverslip.

Figure 5-13 A に示すように、eosin Y を  $100 \mu\text{M}$  含んだ HA-CA(分子量  $500\text{kDa}$ )は緑色光を 10 分間照射することでゲル化を示した。これは、サンプルが示す G'が G''を上回っていることから明らかである。一方で、一般的に用いられている光架橋の一例として、irgacure 2959 を溶解させた HA-CA に対して紫外線を 25 分照射した。結果としては、ほとんど架橋は見られず、HA-CA が示す力学強度は溶液のそれとほとんど違いがみられなかった。この事実は、catechol の吸光度が  $280 \text{ nm}$  付近であるということにも関係しており、開始剤を開裂させるために必要な紫外光のほとんどが吸収されてしまうためであると考えられる<sup>28</sup>。よって、catechol 基を持つ高分子の光架橋に関しては、光架橋を用いることができない。さらに eosin Y を加えたサンプルでも、緑色光を照射しなければ架橋は観察されなかった。さらに Figure 5-14 明らかなように eosin Y が存在しない状態で緑色光を照射した場合、もしくは eosin Y が存在する状態で緑色光を照射しなかった場合のいずれの条件においてもゲルの架橋には至らなかった。以上より HA-CA の架橋には eosin Y と緑色光が必須であるということが明らかとなった。また、Figure 5-13 B から eosin Y の濃度によって、架橋後のサンプルの強



度が多少増減することが確認され、100  $\mu\text{M}$  が適正な濃度であるということが分かった。これは、eosin Y の濃度を上げることによって、サンプルを透過する光の強度が減少してしまうことによるものと考えられる。つまり局所的には強くゲル化するが、全体的なゲルの強度が下がってしまうためだと考えられる。また、Figure 5-13. C から明らかなように、eosin Y を含む HA-CA 水溶液は、緑色光の照射時間依存的にその力学強度を上昇させるということが分かった。以上より、Figure 5-13. D に示す eosin Y の色素増感剤としての作用を支持する結果が得られた。すなわち EY\* は、o-semiquinone ラジカルの生成を伴う catechol 同士の架橋に寄与し、一方で励起された EY\* は catechol、もしくは溶存酸素との接触により基底状態 EY に戻るため、失活することなく緑色光が当たる限り、架橋の促進を続けることが強く示唆された。

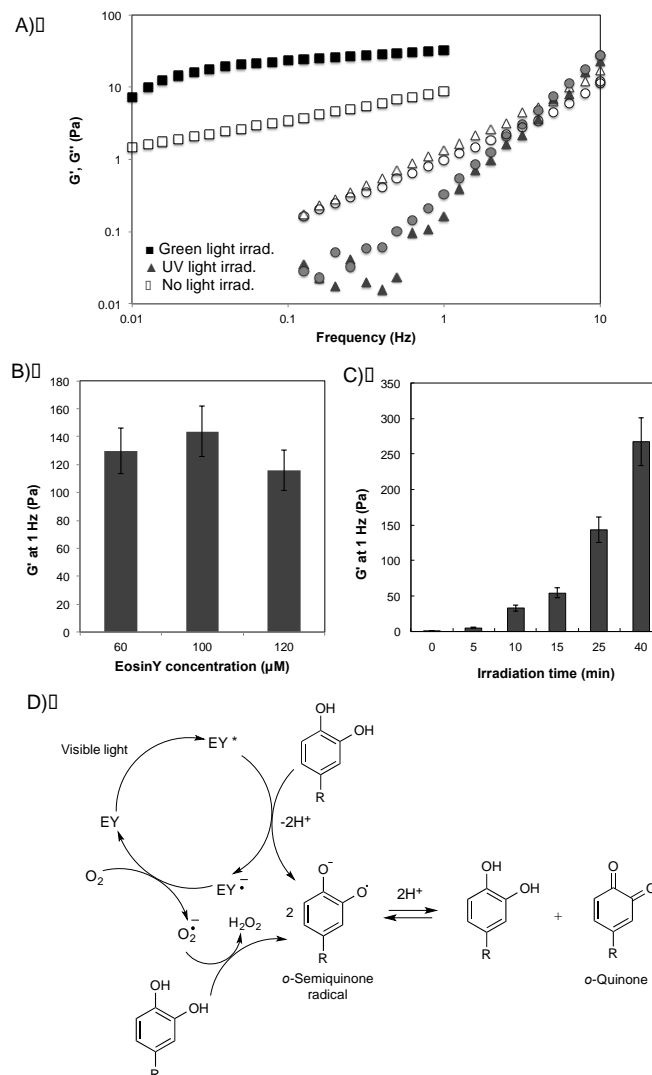


Figure 5-13. Green light-triggered sol-gel transition of HA-CA solutions ( $15 \text{ g L}^{-1}$  in PBS, pH 7.4) in the presence of eosin Y. A) Comparison of the frequency dependence of storage and loss moduli for solutions of HA500-CA (DS = 0.3) after 10 min of green light exposure, after 10 min of UV light exposure and after 10 min without light exposure. B) Influence of eosin concentration on the G' value at 1 Hz after 25 min of green light exposure. C) Variation of the G' value at 1 Hz as a function of green light exposure. D) Proposed mechanism for the photo-oxidation of catechol using green light and eosin Y as a photosensitizer.

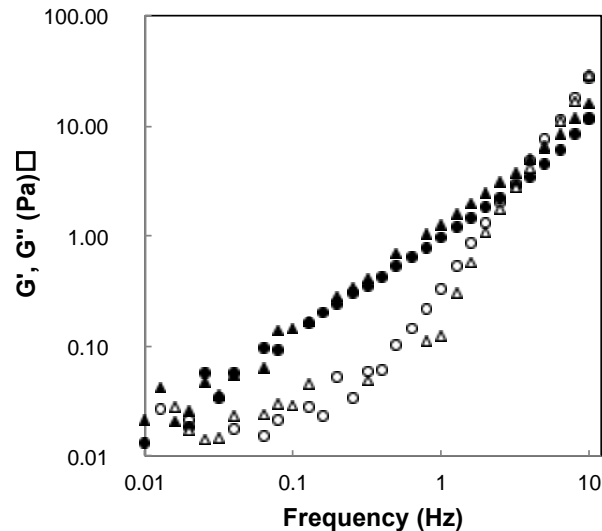


Figure 5-14. Frequency dependence of storage ( $G'$ , open symbols) and loss ( $G''$ , closed symbols) moduli of solutions of HA500-CA (15 g/L in PBS (pH 7.4)), after 25 min of green light exposure in the absence of eosin Y ( $\blacktriangle, \triangle$ ) and, after 25 min without green light exposure in the presence of eosin Y ( $\bullet, \circ$ ).

#### 5.4.6. HA-CA を用いた組織接着評価

Catechol 基によって機能化した高分子を生体組織が有する amino 基、thiol 基、imidazole 基などの求核基と反応をさせて、組織接着を行う研究が今までに数多くなされてきており、catechol 基は酸化によるゲル化を利用したインジェクタブルゲルとしてのみならず、生体組織の接着剤としての能力も有しているということが報告されている<sup>29-31</sup>。本章で取り扱っている HA-CA の接着剤としての応用を検討し、今回は自然酸化によってブタの表皮組織の接着性を評価した。それぞれ分子量 500 kDa、200 kDa の HA-CA を用いて、37°C で所定時間接着させた結果、酸化時間に伴う接着強度の増加が観察された。接着性に対する catechol の導入率および分子量の影響は、最終的に所定時間内に起こるゲル化の度合いと類似の傾向がみられ、分子量が大きく、また導入率が高いほど接着強度が増すという結果が得られた(Figure 5-15)。この接着は強固であり、外科手術で使用されるシアノアクリレート系の接着剤の接着強度と比較しても遜色のない強度を有するということが分かった。また、例えば、分子量 500 kDa の HA-CA で導入率 30% の水溶液を用いてブタの表皮組織を接着させた場合、ブタの組織は 150 g の重りを支えることができるほど強く接着していた。

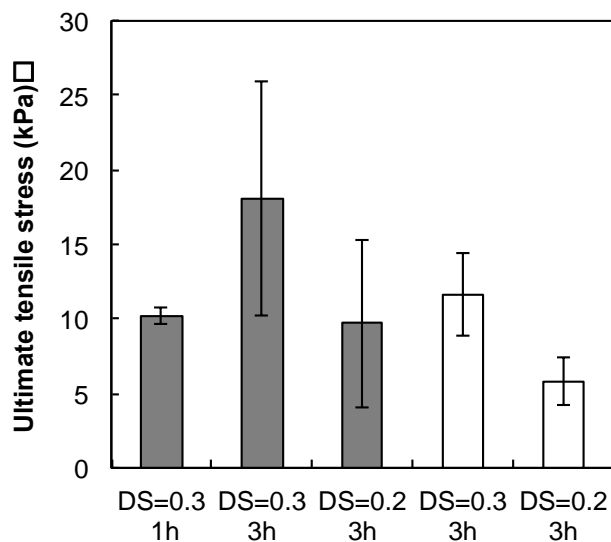


Figure 5-15. Investigation of the potential of HA500-CA (DS = 0.3) solutions for utilization as tissue bioadhesive: average adhesion strength of HA-CA hydrogel ( $15 \text{ g L}^{-1}$  in PBS, pH 7.4) to porcine skin.

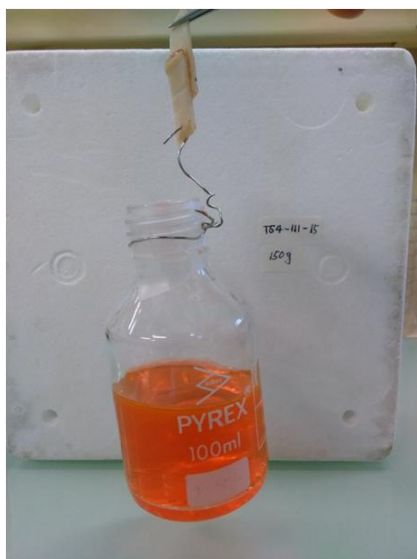


Figure 5-16. A digital photo to demonstrate how strong the HA-CA gel adhered porcine skin pieces.

### 5.5. 結言

SHT の生体適合性を向上させるための検討のため、ゲルを構築する高分子としてヒアルロン酸 (HA) を選択した。側鎖に catechol 基および PBA 基を導入した HA-CA および HA-PBA の水溶液は、生理活性条件において単純な混合をすることでゲル化が起こることを証明した。また、動的粘弾性測定から、このゲルが自己修復特性を有しているということが明らかとなった。これより SHT 法によるハイドロゲルの合成を、生体適合性高くできることが示唆された。例えば、再生医療用の足場材料やインジェクタブルゲルとしての転用も可能であり、さらに 3D プリンターなどの最新機器との組み合わせによって、さらに微細で複雑な形状を有し、複数組成でハイドロゲルを構築するこ

とが期待される(Figure 5-17)。

実験の過程で明らかとなった HA-CA の酸化による架橋現象をさらに詳細に検討し、独自の方法を用いて、人体に対して侵襲性の低い可視光を用いて HA-CA を架橋することに成功した。HA を主原料とした自己修復ゲルと HA-CA を組み合わせた SHT は、優れた生体適合性を有し、人体への埋植後における周辺組織に対しての良好な接着性を示すことも期待される。この性質を活用し、任意形状で構築された任意の組成と硬さを有する細胞培養足場材料の構築が、より生体に侵襲性の少ない条件で作製できるような技術へと応用されることを期待する。

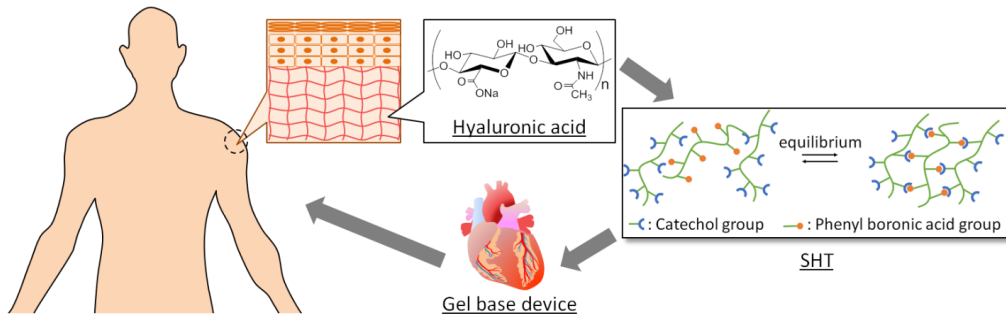


Figure 5-17. A schematic illustration of hydrogel fabrication method via biocompatible SHT method.

## 5.6. 参考文献

1. Shiino, D.; Murata, Y.; Kataoka, K.; Koyama, Y.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y., Preparation and characterization of a glucose-responsive insulin-releasing polymer device. *Biomaterials* **1994**, *15* (2), 8.
2. Matsumoto, A.; Ishii, T.; Nishida, J.; Matsumoto, H.; Kataoka, K.; Miyahara, Y., A synthetic approach toward a self-regulated insulin delivery system. *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, *51* (9), 2124-8.
3. Konno, T.; Ishihara, K., Temporal and spatially controllable cell encapsulation using a water-soluble phospholipid polymer with phenylboronic acid moiety. *Biomaterials* **2007**, *28* (10), 1770-7.
4. Tarus, D.; Hachet, E.; Messenger, L.; Catargi, B.; Ravaine, V.; Auzély-Velty, R., Readily Prepared Dynamic Hydrogels by Combining Phenyl Boronic Acid- and Maltose-Modified Anionic Polysaccharides at Neutral pH. *Macromol. Rapid Commun* **2014**, *35*, 7.
5. Springsteen, G.; Wang, B., A detailed examination of boronic acid-diol complexation. *Tetrahedron* **2002**, *58* (26), 5291-5300.
6. Holten-Andersen, N.; Harrington, M. J.; Birkedal, H.; Lee, B. P.; Messersmith, P. B.; Lee, K. Y.; Waite, J. H., pH-induced metal-ligand cross-links inspired by mussel yield self-healing polymer networks with near-covalent elastic moduli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (7), 2651-5.
7. Waite, J. H.; Tanzer, M. L., Polyphenolic Substance of *Mytilus edulis*: Novel Adhesive Containing L-Dopa and Hydroxyproline. *Science* **1981**, *212* (4498), 3.
8. Ryu, J. H.; Hong, S.; Lee, H., Bio-inspired adhesive catechol-conjugated chitosan for biomedical applications: A mini review. *Acta Biomater* **2015**, *27*, 101-15.
9. Ryu, J. H.; Lee, Y.; Kong, W. H.; Kim, T. G.; Park, T. G.; Lee, H., Catechol-functionalized chitosan/pluronic hydrogels for tissue adhesives and hemostatic materials. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (7), 2653-9.
10. Chung, H.; Grubbs, R. H., Rapidly Cross-Linkable DOPA Containing Terpolymer Adhesives and PEG-Based Cross-Linkers for Biomedical Applications. *Macromolecules* **2012**, *45* (24), 9666-9673.
11. Mehdizadeh, M.; Weng, H.; Gyawali, D.; Tang, L.; Yang, J., Injectable citrate-based mussel-inspired tissue bioadhesives with high wet strength for sutureless wound closure. *Biomaterials* **2012**, *33* (32), 7972-83.
12. Liu, Y.; Meng, H.; Konst, S.; Sarmiento, R.; Rajachar, R.; Lee, B. P., Injectable dopamine-modified poly(ethylene glycol) nanocomposite hydrogel with enhanced adhesive property and bioactivity. *ACS Appl Mater Interfaces* **2014**, *6* (19), 16982-92.
13. Shin, J.; Lee, J. S.; Lee, C.; Park, H.-J.; Yang, K.; Jin, Y.; Ryu, J. H.; Hong, K. S.; Moon, S.-H.; Chung, H.-M.; Yang, H. S.; Um, S. H.; Oh, J.-W.; Kim, D.-I.; Lee, H.; Cho, S.-W., Tissue Adhesive Catechol-Modified Hyaluronic Acid Hydrogel for Effective, Minimally Invasive Cell Therapy. *Advanced Functional Materials* **2015**, *25* (25), 3814-3824.
14. Techawanitchai, P.; Idota, N.; Uto, K.; Ebara, M.; Aoyagi, T., A smart hydrogel-based time bomb triggers drug release mediated by pH-jump reaction. *Sci Technol Adv Mater* **2012**, *13* (6), 064202.
15. Yang, J.; Cohen Stuart, M. A.; Kamperman, M., Jack of all trades: versatile catechol crosslinking mechanisms. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43* (24), 8271-8298.
16. Kalyanaraman, B.; Felix, C. C.; Sealy, R. C., Semiquinone anion radicals of catechol(amine)s, catechol estrogens, and their metal ion complexes. *Environmental Health Perspectives* **1985**, *64*, 185-98.
17. Burzio, L. A.; Waite, J. H., Cross-Linking in Adhesive Quinoproteins: Studies with Model Decapeptides. *Biochemistry* **2000**, *39* (36), 11147-11153.
18. Bonino, C. A.; Samorezov, J. E.; Jeon, O.; Alsberg, E.; Khan, S. A., Real-time in situ rheology of alginate hydrogel photocrosslinking. *Soft Matter* **2011**, *7*, 11510-11517.
19. Kavanagh, G. M.; Ross-Murphy, S. B., Rheological characterization of polymer gels. *Progress in Polymer*

*Science* **1998**, 23 (3), 533-562.

20. Andersen, S. O.; Jacobsen, J. P.; Bojesen, G.; Roepstorff, P., Phenoloxidase catalyzed coupling of catechols. Identification of novel coupling products. *Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology* **1992**, 1118 (2), 134-8.
21. Lee, B. P.; Dalsin, J. L.; Messersmith, P. B., Synthesis and Gelation of DOPA-Modified Poly(ethylene glycol) Hydrogels. *Biomacromolecules* **2002**, 3 (5), 1038-1047.
22. Hong, S.; Yang, K.; Kang, B.; Lee, C.; Song, I. T.; Byun, E.; Park, K. I.; Cho, S.-W.; Lee, H., Hyaluronic Acid Catechol: A Biopolymer Exhibiting a pH-Dependent Adhesive or Cohesive Property for Human Neural Stem Cell Engineering. *Advanced Functional Materials* **2013**, 23 (14), 1774-1780.
23. Shin, J.; Lee, J. S.; Lee, C.; Park, H.-J.; Yang, K.; Jin, Y.; Ryu, J. H.; Hong, K. S.; Moon, S.-H.; Chung, H.-M.; Yang, H. S.; Um, S. H.; Oh, J.-W.; Kim, D.-I.; Lee, H.; Cho, S.-W., Tissue Adhesive Catechol-Modified Hyaluronic Acid Hydrogel for Effective, Minimally Invasive Cell Therapy. *Advanced Functional Materials* **2015**, 25 (25), 3814-3824.
24. Patenaude, M.; Smeets, N. M. B.; Hoare, T., Designing Injectable, Covalently Cross-Linked Hydrogels for Biomedical Applications. *Macromolecular Rapid Communications* **2014**, 35 (6), 598-617.
25. Turturro, M. V.; Sokic, S.; Larson, J. C.; Papavasiliou, G., Effective tuning of ligand incorporation and mechanical properties in visible light photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels dictates cell adhesion and proliferation. *Biomedical Materials (Bristol, United Kingdom)* **2013**, 8 (2), 025001, 12 pp.
26. Kang, X.; Yu, Y.; Bao, Y.; Cai, W.; Cui, S., Real time quantification of the chemical cross-link density of a hydrogel by in situ UV-vis spectroscopy. *Polymer Chemistry* **2015**, 6 (23), 4252-4257.
27. Zwicker, E. F.; Grossweiner, L. I., Transient measurements of photochemical processes in dyes. II. The mechanism of the photosensitized oxidation of aqueous phenol by eosin. *Journal of Physical Chemistry* **1963**, 67, 549-55.
28. Bahney, C. S.; Lujan, T. J.; Hsu, C. W.; Bottlang, M.; West, J. L.; Johnstone, B., Visible light photoinitiation of mesenchymal stem cell-laden bioresponsive hydrogels. *European Cells and Materials* **2011**, 22, 43-55.
29. Deming, T. J., Mussel byssus and biomolecular materials. *Current Opinion in Chemical Biology* **1999**, 3 (1), 100-105.
30. Waite, J. H.; Qin, X., Polyphosphoprotein from the Adhesive Pads of *Mytilus edulis*. *Biochemistry* **2001**, 40 (9), 2887-2893.
31. Waite, J. H.; Tanzer, M. L., The bioadhesive of *Mytilus* byssus: a protein containing L-DOPA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1980**, 96 (4), 1554-61.

## 第 6 章

### 結言

本論文では、自己修復ゲルを、前駆体という中間材料として用いることを検討した。自己修復ゲルは、今まで建築部材になどへの応用が盛んに検討されていた材料であった。そのため、もっぱらその物性を測定し、自己修復のメカニズムを解明するということが自己修復ゲルの一般的な研究報告であった。しかしながら、本論文で提唱した自己修復テンプレート法に対して、独自に開発した自己修復ゲルを応用することによって、ゲルを自由自在に形状構築することができるようになった。この研究を通して得られた知見を以下に示す。

第2章では、自己修復テンプレートを開発するための第一段階として、自己修復ゲルの開発についてまとめた。自己修復ゲルの母材として、末端にリン酸基を有する四分岐 PEG (4-arm PEG-phos) は、金属イオンとの混合によって迅速に架橋することを確認した。この架橋点形成は、金属イオンとリン酸基の間で起こる錯形成によるものであり、架橋点は解離と再結合を繰り返す動的な結合であるということを確認した。この結合は、例えば大過剰の水に浸漬させること、もしくは競争配位子としてフリーのリン酸を加えることで容易に崩壊させることが可能であった。この事実から、架橋点が動的に結合をしていることが明らかとなった。引張試験、動的粘弾性測定の結果から、自己修復ゲルは破壊されても経時的にその破壊を修復することができるということが分かった。したがって、確かに 4-arm PEG-phos と金属イオンを混合することで自己修復ゲルが作製できた。自己修復ゲルを作製する過程で、4-arm PEG-phos 水溶液は特定の金属イオン( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$ ,  $\text{V}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ )によってゲル化する一方で、それ以外の金属イオン( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{Ru}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Pd}^{2+}$  or  $\text{Pb}^{2+}$ )はゲル化しないということが明らかとなった。リン酸基と金属イオンの間で生じるクーロン力と、金属イオンの配位子場上の水の交換速度定数の二つのパラメーターを考察することで、ゲル化する金属イオンの条件を選定することができた。結果としては、リン酸基と金属イオンの間で強いクーロン力が発生し、配位子場上の水分子の交換が活発なイオン(置換活性なイオン)でのみ 4-arm PEG-phos のゲル化が起こるということを明らかとした。加えて、金属イオンの酸化還元によって、ゲルのゾルゲル転移を容易に起こすことができた。以上より、ハイドロゲルを構築するイオンの種類を明かとし、4-arm PEG-phos 水溶液を架橋するイオンを予め予測することが可能となった。この自己修復ゲルは、例えば剪断応力を加えることによってハイドロゲルの力学的な強度を低下させること(チキソ性)ができ、加えてゾルゲル転移も可能であることから、インジェクタブルゲルへの転用も期待される、

第3章では、著者が開発した自己修復ゲルを、自己修復テンプレート法の前駆体として応用することを検討した。4-arm PEG-phos 水溶液と光架橋性高分子(PEGDA または PNHA)の混合水溶液は、金属イオン水溶液の添加後、均質なゲル(自己修復テンプレート)を形成することが確認された。自己修復ゲルに貫入した光架橋高分子は、自己修復ゲルネットワーク内においても架橋することを明かとした。自己修復テンプレートの界面の経時的な顕微鏡観察から、自己修復テンプレートは時間依存的に界面を修復するということが分かった。作製した自己修復テンプレートは、固体であるため縦、横、高さ方向、すなわち三次元方向に対して積層することができた。これは今まで水溶液を前駆体としておこなわれてきたハイドロゲル作製法では実現することが不可能とされていた形状や、組成の組合せによってハイドロゲルの作製を実現するに至った。自己修復テンプレートを積層した後、界面を自身が修復することの影響を引張試験によって評価したところ、最終的に出来上がるハイドロゲルの界面の強度は自己修復時間に依存して強くなるという結果が得られた。したがって、確かに自己修復テンプレートは、自由自在に積層可能であり、さらに界面を自己修復によって消失させることによって、一般的に問題となるゲルのつなぎ目の強度を低下させずにゲルの作製ができるということが明らかとなった。この章の検討によって、今まで水溶液前駆体を用いてゲルを



三次元的に微細加工する際は、リソグラフィーや 3D ゲルプリンターを使用する必要があったが、自己修復テンプレート法を用いることで、ハンドメイドでも自由な立体構造を構築することができるようになった。この方法は、最新の 3D プリンターと組み合わせるとさらに微細な加工を施すこともできると考えられ、新たな DDS キャリアや細胞培養足場などを開発する新技術となることが期待される。

4 章では自己修復テンプレート法を用いて、ハイドロゲルを自由に構築し、得られたハイドロゲルの構造的な機能を評価した。並行平板のゲルでは示すことのない機能を、ゲルの形状を変化させるだけで発揮させることができるようになった。PEGDA を貫入させた自己修復テンプレートを用いて、箱型のゲルを作製することができた。この箱型のゲルは、内部に細胞を内包させることができた。ゲルに内包された細胞は、強酸条件などの過酷条件においても生存率良く存在することができた。生存率のみならず、処理後の細胞活性も、未処理の細胞と同等であるということが Alamar blue アッセイによって明らかとなった。この結果から、中空の箱をゲルで作ることによって、構造的に、内部に物体を閉じ込めることができるようになり、DDS キャリアや細胞、組織を過酷条件において保護するようなゲルを作製することができた。さらに、PNHA を貫入させた自己修復テンプレートと、PEGDA を貫入させた自己修復テンプレートをそれぞれ張り合わせることで、アクチュエーター様のゲルを作製することもできた。今回の検討では、キャピラリー状のゲルを作製し、内径の温度による収縮を観察した。結果として、ゲルは 40°C において PNHA ゲルの部分のみ収縮が観察された。このゲルは、例えば温度応答性のバルブや、ポンプなどへと応用ができると考えられる。以上のように、自己修復テンプレートを用いてゲルを自由自在に作製することによって、ハイドロゲルに構造的な機能を付与することが可能となった。この技術を応用することで、今まで並行平板、円柱、球状といった比較的シンプルな形状で作製されていた DDS キャリアやソフトアクチュエーターを、複雑な形状で、比較的容易に作製できるようになった。ゲルの母材となるポリマーを機能化させることに加えて、ゲルの形状そのものにも工夫を加えることによって、作製したゲルデバイスに新たな機能を付与することができ、今後のゲルデバイス開発が加速的に行われるようになることが期待された。

5 章では、自己修復テンプレートの母材となる自己修復ゲルの生体適合性を高める検討を行った。4 章までの検討では、自己修復ゲルネットワークを作製するために、金属イオンを用いてきたが、細胞毒性を示すことから、使用をなるべく避けるべきだと考えた。5 章の検討では、優れた生体適合性を有するヒアルロン酸(HA)の側鎖をドーパミン、フェニルボロン酸によって機能化させた HA-CA と HA-PBA をそれぞれ水溶液にして、混合させると、速やかにゲル化が確認された。このゲルは、動的粘弾性測定により、自己修復特性を有することが明らかとなった。PBA とジオール基との間の相互作用は古くから動的結合、またはグルコース応答の結合として用いられてきているが、強い結合を示すのは pH が 8 を超えてからである。今回開発した HA-CA と HA-PBA 混合自己修復ゲルは、生理活性条件においても架橋点を形成し、ゲルになるということが明らかとなった。本検討の途中で、HA-CA が酸化によって架橋点を形成するということが判明した。この自然酸化による架橋は、酸化剤を使用せずに架橋が進むことが分かった。さらに色素増感剤を添加した状態で可視光線を当てることによって、その酸化プロセスを促進でき、15 分程度の可視光線の照射でゲルを架橋することができた。HA-CA と HA-PBA から構成される自己修復ゲルと、HA-CA の自然酸化、もしくは可視光による光架橋によって、非常に生体親和性高く様々な形状のハイドロゲルデバイスを構築することができるようになることが期待される。

以上より、自己修復ゲルの開発に始まった、本研究は、自己修復テンプレートという材料に形を

変え、ハイドロゲルの構築に対して大きく貢献することができるようになった。今後、自己修復テンプレートは、産業、医療、薬学など、学問の領域を超えた幅広い分野にわたって貢献することを期待する。

### 【発表リスト】

本研究は、以下に示す論文、学会において発表した。

### 【発表論文】

1. **Takeshi Sato** and Mitsuhiro Ebara "Fabrication of Temperature-responsive Hydrogels in Arbitrarily Geometries Using A Self-Healing Template" *Chemistry Letters*, 2016, **45**, 1394–1396
2. **Takeshi Sato**, Takao Aoyagi, Koichiro Uto and Mitsuhiro Ebara "An Intriguing Method for Fabricating Arbitrarily Shaped “Matreshka” Hydrogels Using A Self-Healing Template" *Materials*, 2016, 9, 864
3. Yohei Kotsuchibashi, Mitsuhiro Ebara, **Takeshi Sato**, Yinan Wang, Rajender Rajender, Dennis G. Hall, Ravin Narain and Takao Aoyagi, "Spatiotemporal Control Of Synergistic Gel Disitefration Consisting Of Boroxole-and Glyco-Based Polymers via Photoinduced Proton Transfer", *J. Phys. Chem. B*, 2015, **119**, 2323-2329
4. **Takeshi Sato**, Takao Aoyagi, Mitsuhiro Ebara, Rachel Auzéry-Velty " Catechol-modified hyaluronic acid: In situ-forming hydrogels by auto-oxidation of catechol or photooxidation using visible light" *Polymer Bulletin*; in press
5. **Takeshi Sato**, Mitsuhiro Ebara, Shinji Tanaka, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi, and Takao Aoyagi "Rapid self-healable poly(ethylene glycol) hydrogels formed by selective metal-phosphate complexes" *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2013,**15**, 10628-10635
6. “Materials Nanoarchitectonics: Nano-Technology to Nano-Architectonics” Wiley (書籍：5章 5.4 担当)  
(投稿中)

### 【国際学会における研究発表】

1. ○T. Sato, M. Ebara, S. Tanaka, T. Asoh, A. Kikuchi and T. Aoyagi, “Dynamically restructuring PEG hydrogel networks formed with reversible crosslinks between phosphoryl groups and multivalent metal ions” (poster) 「9<sup>th</sup> International Gel Symposium 2012」 PA-09, Ibaraki, Japan 2012 年 10 (ポスター 査読あり)
2. ○T. Sato, M. Ebara, S. Tanaka, T. Asoh, A. Kikuchi and T. Aoyagi, ”A self-healable hydrogel based on metal ions and biocompatible poly(ethylene glycol)” (poster) 「2<sup>nd</sup> International Conference on Biomaterials Science in Tsukuba」 P111, Ibaraki, Japan 2013 年 2 月 (ポスター 査読あり)
3. ○T. Sato, M. Ebara, S. Tanaka, T. Asoh, A. Kikuchi and T. Aoyagi, “ A self-healable hydrogel via selective metal-ligand complex” (poster) 「2013 Tsukuba Nanotechnology Symposium 」 Ibaraki, Japan 2013 年 7 月 (ポスター 査読なし)
4. ○T. Sato, M. Ebara, S. Tanaka, T. Asoh, A. Kikuchi and T. Aoyagi, “Self-healable and injectable PEG hydrogels via selective metal-ligand interaction” (Poster)「BMES Annual meeting 2013」 Seattle, The U. S. A. 2013 年 9 月 (ポスター 査読あり)

5. ○Takeshi Sato, Mitsuhiro Ebara, Shinji Tanaka, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi, Takao Aoyagi, "Poly(ethylene glycol) based self-healing hydrogels formed by ion selective interaction" 「2nd Hoffman Family Symposium International Symposium on Smart Biomaterials」 2014 年 3 月 (ポスター 査読なし)
6. ○Takeshi Sato, Mitsuhiro Ebara, Shinji Tanaka, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi, Takao Aoyagi, "Self-healing 4-arm PEG hydrogels via selective metal-ligand interaction", 「MANA International Symposium 2014」 Ibaraki, Japan 2014 年 3 月 (ポスター 査読なし)
7. ○Takeshi Sato, Mitsuhiro Ebara, Takao Aoyagi, "Self-healing Hydrogels with Arbitrary Shapes using Photo Cross-linkable Polymers", 「NIMS Conference 2014」 Ibaraki, Japan 2014 年 6 月 (ポスター 査読なし)
8. ○Takeshi Sato, Mitsuhiro Ebara, Takao Aoyagi, "Dynamically Tunable-Nanoarchitectonics to Construct Arbitrarily Shaped Hydrogels", 「2014 Tsukuba Nanotechnology Symposium (TNS '14)」 Ibaraki, Japan 2014 年 7 月 (ポスター 査読なし)
9. ○Takeshi Sato, Mitsuhiro Ebara, Akihiko Kikuchi, Takao Aoyagi, "Studies on PEG-based hydrogel via metal-ligand coordination bonding and application to self-healing materials" 「ESSON 2014」, France, Grenoble 2014 年 8 月 (ポスター 査読なし)
10. ○Takeshi Sato, Mitsuhiro Ebara and Takao Aoyagi, "Arbitral Hydrogel fabrication Using A Seld-Healing Template", 「3rd Hoffman Family Symposium」 Gwangju, Korea, 2015 年 3 月 (ポスター 査読なし)
11. ○Takeshi Sato, Akihiko Kikuchi, Takao Aoyagi and Mitsuhiro Ebara, "A Poly(ethylene glycol) Based Self-healing Gel for Biomedical Application", 「Japan-Thailand Joint Meeting on Functional Nanomaterials 2016」, Bangkok Thailand, 2016 年 5 月 (口頭 査読なし)
12. ○Takeshi Sato, Takao Aoyagi and Mitsuhiro Ebara, "A New Application Method of Poly(ethylene glycol) Base Self-healing hydrogel in biomedical field" 「International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology」, 2016 年 7 月 (ポスター 査読なし)
13. ○Takeshi Sato and Mitsuhiro Ebara, "An Intriguing Method for Hydrogel Fabrication with Arbitrary Structure and Multinally Composition", 「2nd International Symposium on Biointerface Science and Engineering」, Taipei, Taiwan, 2016 年 9 月 (ポスター 査読なし)

#### 【国内学会における研究発表】

1. ○佐藤健、荏原充宏、田中信治、麻生隆彬、菊池明彦、青柳隆夫 “分岐型ポリエチレングリコールと多価金属イオンを用いたインジェクタブルゲルの開発”(口頭発表)「第 61 回高分子学会年次大会」3G15 神奈川 2012 年 5 月
2. ○佐藤健、荏原充宏、田中信治、麻生隆彬、菊池明彦、青柳隆夫 “金属イオン選択的なナノ動的架橋を有する自己修復生体材料の設計”(ポスター発表)「第6回 ナノバイオメディカル学会」P-1 茨城 2012年 7月

3. ○佐藤健、荏原充宏、田中信治、麻生隆彬、菊池明彦、青柳隆夫 ”金属錯体を架橋点に持つ高速自己修復ポリエチレングリコールゲル”(口頭発表)「第 61 回高分子学会討論会」1I04 愛知 2012 年 9 月
4. ○佐藤健、荏原充宏、田中信治、麻生隆彬、菊池明彦、青柳隆夫 ”自己修復を起こす金属錯体超分子ゲル”金属錯体を架橋点に持つ高速自己修復ポリエチレングリコールゲル”(ポスター発表)「ゲルワークショップイン名古屋」愛知 2012 年 9 月
5. ○佐藤健、荏原充宏、田中信治、麻生隆彬、菊池明彦、青柳隆夫 ”特定の金属イオンのみを認識する自己修復超分子ゲル”(口頭発表)「第 22 回インテリジェント材料/システムシンポジウム」B14, 東京 2013 年 1 月
6. ○佐藤健、荏原充宏、田中信治、麻生隆彬、菊池明彦、青柳隆夫 ”金属イオン選択的に高速ゲル化する自己修復ゲル”(ポスター発表)「第 24 回ゲル研究討論会」P20 東京 2013 年 1 月
7. ○佐藤健、荏原充宏、田中信治、麻生隆彬、菊池明彦、青柳隆夫 ”生体適合性ポリ(エチレングリコール)を用いた自己修復能を有するインジェクタブルゲルの開発”(ポスター発表)「医工連携フォーラム 2013」P-8 茨城 2013 年 1 月
8. ○佐藤健、荏原充宏、田中信治、麻生隆彬、菊池明彦、青柳隆夫 ,” 選択的金属錯形成より成る超分子自己修復ゲル”(口頭英語発表)「第 62 回高分子学会年次大会」1N25 京都 2013 年 5 月
9. ○佐藤健、荏原充宏、田中信治、麻生隆彬、菊池明彦、青柳隆夫 ,” リン酸基-金属イオン配位結合を架橋点に有する自己修復ゲルの力学的特性評価”(口頭発表)「第 62 回高分子学会討論会」2F14 金沢 2013 年 9 月
10. ○佐藤健、荏原充宏、田中信治、麻生隆彬、菊池明彦、青柳隆夫 ,”錯体架橋型自己修復ゲルのゲル化駆動力”(ポスター発表)「ゲルワークショップイン加賀」金沢 2013 年 9 月
11. ○佐藤健、荏原充宏、田中信治、麻生隆彬、菊池明彦、青柳隆夫 “界面を繰り返し修復する自己修復ゲルの設計 / A Self-healing Interface That Can Be Repetitively Repair by Metal Ligand Interaction”(口頭発表)「第 23 回 日本 MRS (MRS-J)年次大会」 M-O11-003  
横浜開港記念会館 神奈川 2013 年 12 月
12. ○佐藤健、荏原充宏、田中信治、麻生隆彬、菊池明彦、青柳隆夫 “金属イオンにより架橋された自己修復性ハイドロゲルの金属イオン種による物性への影響”(口頭発表)「第 25 回 高分子ゲル研究討論会」東京 2014 年 1 月
13. ○佐藤健、荏原充宏、田中信治、麻生隆彬、菊池明彦、青柳隆夫 “リン酸基-金属イオン錯体を架橋点とする四分岐型ポリエチレングリコールインジェクタブルゲル”(ポスター発表)「医工連携フォーラム 2014」茨城 2014 年 1 月
13. ○佐藤健、荏原充宏、田中信治、麻生隆彬、菊池明彦、青柳隆夫 “自己修復ゲルを鋳型とする三次元積層型傾斜材料”(口頭発表)「第 63 回 高分子年次大会」愛知 2014 年 5 月

14.佐藤健, 青柳隆夫, ○荏原充宏 “自己修復テンプレートの母材となる PEG-base 自己修復ゲルの開発と特性評価”(ポスター発表)「第 65 回 高分子学会年次大会」兵庫 2016 年 05 月

15.佐藤健, 青柳隆夫, ○荏原充宏 “自己修復テンプレートを用いた生体適合性ハイドロゲルデバイス構築法”(口頭発表)「第 65 回 高分子学会年次大会」兵庫 2016 年 05 月

16. 佐藤健, 青柳隆夫, ○荏原充宏 “自己修復ゲル構築における金属イオンが与える物性変化とテンプレートへの応用”(ポスター発表)「第 65 回 高分子学会討論会」神奈川 2016 年 09 月

17. 佐藤健, 青柳隆夫, ○荏原充宏 “自己修復ゲルの鋳型としての応用と開発したゲルベースデバイスの性能評価”(口頭発表)「第 65 回 高分子学会討論会」神奈川 2016 年 09 月

### 【受賞歴等】

”ゲルワークショップイン名古屋” 優秀ポスター賞 2012 年

“インテリジェント材料/システムシンポジウム” 奨励賞 2012 年

“第 23 回日本 MRS(MRS-J)年次大会” Award for Encouragement of Research in Materials Science 2013 年

"筑波大学オナーズプログラム 採用" 2013 年 4 月

"TUS Award 2013" 2014 年 3 月

"日本学術振興会特別研究員 DC1 採用"2014 年 4 月

### 【その他】

2014 年 8 月~2014 年 12 月 フランス、グルノーブル CERMAV-CNRS の Rachel Auzéry-Velty 研究室へ留学 (オナーズプログラムのご支援を頂き留学)

2015 年 4 月~2015 年 12 月 フランス、グルノーブル CERMAV-CNRS の Rachel Auzéry-Velty 研究室へ留学

**【謝辞】**

本研究を行うにあたり、学生を第一に考え、優しく、時に厳しくご指導とご鞭撻を賜りました筑波大学数理工学物質科学研究科 荏原充宏 准教授、竹内正之 教授、日本大学理工学部 青柳隆夫 教授、東京理科大学基礎工学部 菊池明彦 教授、大阪市立大学 麻生隆彬 博士に心より感謝の意を表します。

本論文の執筆にあたり、ご指導とご助言をくださいました筑波大学大学院数理工学物質科学研究科 長崎幸夫 教授、内藤昌信 准教授、に心より感謝いたします。

本論文第2章において自己修復ゲルの原料となる四分岐 PEG をご提供くださり、また研究のディスカッション、ご指導をくださいました日油株式会社 田中信治 様、動的粘弾性測定装置の使用に際して多大なるご協力を賜りました筑波大学大学院数理工学物質科学研究科 田口哲志 准教授に心より感謝いたします。

本論文5章において直接の指導と、フランスにおける文化の交流、生活を支えてくださいました Grenoble Alpes University; CERMAV-CNRS Rachel Auzély-Velty 教授に心より感謝の意を表します。

つくばナノテク研究拠点産学連携人材育成プログラム（オナーズプログラム）の連携コーディネーターを務めてくださった堀池靖浩 博士、北島正弘 博士、ハイドロゲルの知見から、私のあらゆる質問にお答えいただき、拙いデータに熱心にご助言をくださいました理化学研究所 長田義仁 博士に深く感謝いたします。

オナーズプログラム海外武者修行におきまして、フランスグルノーブルへの渡航の手続きおよびフランスでの生活を支えてくださいました浅川潔 博士、鈴木波子 様に深く御礼申し上げます。また、留学における金銭的なサポートを下されたオナーズプログラムの運営委員の皆様にも心より感謝申し上げます。

フランス、グルノーブルにおいて生活を支えてくださった磯部紀之 博士、塩田仁志 博士、伊藤正明 様に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、盛んにディスカッションをくださり、私の研生活を支え、実りのあるものにしてくださった静岡理工科大学 小土橋陽平 博士、早稲田大学 井戸田直和 博士、純真学園大学 滑川亘希 博士、物質材料研究機構の宇都甲一郎 博士、Sharmy Mano Saimon 博士、Giancarlo Forte 博士、Stephania Pagliari 博士、Techawanitchai Prapatosorn 博士、Young -Jin Kim 博士、Sara Romanazzo 博士、Ewelina Zawazak 博士、Monika Bill 博士、Janice Tam Kalvan 博士、Lin Weichih 博士、Xu Baijao 博士、Shou Qinghui 博士、中川泰宏 氏、栗本理央 氏、新山瑛理 氏、高井僚 氏、野村奈生人 氏、田辺貫太 氏、柘植美礼 氏、荏原愛 博士、廣山昌子 氏、佐伯純子 氏、金田尚子 氏、笠谷しいな 氏、野尻希和 氏、飛鷹房子 氏、松本美友希 氏、伊藤芳江 氏に深く感謝申し上げます。

研究のアウトリーチ活動にてお世話になりました物質・材料研究機構MANAアウトリーチチームの葉山雅 氏、アウトリーチチームの皆さまへ心より感謝申し上げます。

本研究は、日本学術振興会 特別研究員 DC1 として遂行されたものであり、科研費；26・5612 と特別研究奨励金を賜りました日本学術振興会に深く感謝申し上げます。

最後に、日頃より私の生活を気にかけて、支えてくださった家族、俊二、喜美江、環に心より感謝申し上げます。