

## 温度と pH に応答する相互貫入型ヒドロゲル膜の作製

金安由里子・白石浩平・杉山一男

### Preparation of Hydrogel Films Composed of Thermo- and pH-Responsive Interpenetrating Polymer Network

Yuriko KANEYASU\*, Kohei SHIRAISHI\* and Kazuo SUGIYAMA\*

#### Abstract

The novel thermo- and pH-responsive interpenetrating polymer network hydrogel films (IPN: r-IPN and b-IPN) as biomedical materials were prepared from the polymerization of N-isopropylacrylamide [NiPAAm] in the presence of methylenebisacrylamide as a cross-linker and random or block copolymers composed of thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide)[PNiPAAm] segments and pH-responsive poly(O-methacrylyl-L-serine)[poly(SerMA)] segment. The random copolymer was prepared from the copolymerization of NiPAAm and SerMA precursor initiated with 2,2'-dimethylazobisisobutyrate (MAIB) as an initiator. The block copolymer was prepared from the radical polymerization of SerMA precursor initiated with the PNiPAAm azo-initiator. Two kinds of hydrogel, r-IPN and b-IPN hydrogel, exhibited the reversible volume phase transition, swelling  $\leftrightarrow$  shrinking, behavior in response to external stimuli such as temperature and pH.

Key words: IPN / Hydrogel / Thermo- and pH-Responsive / Swelling  $\leftrightarrow$  Shrinking Behavior / Random Copolymer / Block copolymer / Polymer Azo-Initiator

#### 1. 緒言

僅かな温度変化に対応して物理的あるいは化学的特性が変化する温度応答性ポリマーはナノテクノロジーや生医学分野で用いるインテリジェント材料として盛んに研究されている<sup>1-3)</sup>。ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PNiPPAm)は水系で温度変化に応答してコンフォメーション変化—コイル—グロビュール転移—に伴って素早い体積変化が起こる<sup>4)</sup>。この現象は、下限臨界溶液温度

(LCST)以下では、PNiPPAm は水和が支配的で主鎖はランダムコイル状となり水中に広がっているが、LCST 以上では、熱運動が盛んになるため水素結合が切断され、主鎖の疎水性相互作用が支配的となって凝集・脱水が起こることに起因する。同様に、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド(HPMA)とアルキルメタクレートとの一連のランダムコポリマーも温度応答性ポリマー材料である<sup>8,9)</sup>。温度応答性 HPMA—ジメチルシロキサンプロックコポリマー—へ

\*近畿大学工学部生物化学工学科

\*Department of Biotechnology and Chemistry,  
Faculty of Engineering, Kinki University





8g(2.29mmol) と トリエチルアミン (TEA) 0.253g (2.51mmol) のクロロホルム溶液 200mL を入れ、V501-Cl 0.363g (1.14mmol) のクロロホルム溶液 100mL を氷冷下、かき混ぜながら 1h かけて少量ずつ滴下した。滴下終了後、さらに室温で 1 昼夜かき混ぜ続けた。その後、反応混合物を 1%塩酸 200ml で 5 回洗浄した。クロロホルムを留去して得られた固体は水に溶解させた後、メンブレンフィルター-Cellu Sep T1 を用いて 3 日間、透析した。透析液を凍結乾燥すると Azo-poly(NiPAAm) が得られた。分子量は塩化メチレンを展開剤とする GPC から求めた。収量(収率) : 6.20g(72.0%), 分子量(Mn) :  $7.0 \times 10^3$ 。

## 2.4 温度と pH 変化にตอบสนองするコポリマーゲル前駆体の合成

### 2.4.1 ランダムコポリマーゲル前駆体

#### Gel(NiPAAm-r-Boc-SerMA-Ph<sub>2</sub>) の合成

Boc-SerMA-Ph<sub>2</sub> 1.0g(7.9mmol) のテトラヒドロフラン溶液 6mL, NiPAAm 3.0g(92.1mmol) と MBAAm 0.409g(1mmol) の無水エタノール溶液 4ml, APEH 0.061g (1mmol) をシリコンゴム製のフレーム(d=0.5mm, 80×170mm) に流し込み、両面をガラス板で挟み、60°C, 24h 重合して板状の [Gel(NiPAAm-r-Boc-SerMA-Ph<sub>2</sub>)] を得た。エタノールで数回洗浄したのち実験に供した。

### 2.4.2 ブロックコポリマーゲル前駆体 Gel(NiPAAm-b-Boc-SerMA-Ph<sub>2</sub>) の合成

Boc-SerMA-Ph<sub>2</sub> 0.847g(0.193mmol) のテトラヒドロフラン溶液 3ml, NiPAAm 1.5g(0.021mmol) と MBAAm 0.007g(0.004mmol) の無水エタノール溶液 4mL, Azo-poly(NiPAAm) 2g(0.29 mmol) を用いて 2-5-1 に準じて板状の Gel(NiPAAm-b-Boc-SerMA-Ph<sub>2</sub>) を得た。エタノールで数回洗浄したのち実験に供した。

## 2.5 温度と pH の変化にตอบสนองする IPN ゲルの合成

### 2.5.1 IPN 前駆体の作製

Gel(NiPAAm-r-Boc-SerMA-Ph<sub>2</sub>) 2g, NiPAAm 2g (0.0176mol), MBAAm 0.055g(0.02mol), MAIB 0.041g(0.01mol) をエタノール 10mL に溶解し、上述の重合用ガラスフレーム中に注入、10°C, 24h 静置した後、60°C, 24h 重合して板状のランダムコポリマー型 IPN 前駆体 (r-IPN-prec) を得た。r-IPN-prec はエタノール中に 48h 静置したのち、真空下に乾燥した。ブロックコポリマー型 IPN 前駆体 (b-IPN-prec) も Gel(NiPAAm-b-Boc-SerMA-Ph<sub>2</sub>) を用いて同様に作製した。

### 2.5.2 IPN 前駆体中の脱保護基

板状に成形した IPN 前駆体である r-IPN-prec および b-IPN-prec をエタノール中に 48h 静置する。ついで、玉付

き冷却管を備えた 100mL のセパラブルフラスコにそれぞれ r-IPN-prec および b-IPN-prec を入れ、80%トリフルオロ酢酸 40mL 加えて 12h 還流する。脱保護基反応の終了後、生成物はエタノールで数回洗浄し、さらにエタノール中で 48h 静置した。ついで、リン酸緩衝液(pH5.7)中に IPN を浸漬したのち、さらに、蒸留水中に 24h 静置してそれぞれランダムコポリマー型 IPN ヒドロゲル(r-IPN)とブロックコポリマー型 IPN ヒドロゲル(b-IPN)を得た。

## 2.6 相転移温度測定

1wt% poly(NiPAAm)-OH 水溶液をガラス製セルに入れ 20°C~40°C の温度範囲で昇温速度 1°C/min とし、所定温度で 10min 静置して 600nm における透過率を UV 測定して下限臨海溶液温度(LCST)を求めた。急激に透過度が減少(濁度が上昇)し、白濁するときの温度を LCST とした。

## 2.7 温度および pH 変化による IPN の膨潤-収縮測定

乾燥した r-IPN ゲルと b-IPN ゲル(これらのゲルの重量を W<sub>a</sub> とする)をそれぞれリン酸バッファー溶液(pH4.5, pH5.7, pH8)に入れ、20°C で 24h 静置したのち、40°C に昇温し、所定時間ごとに IPN の湿潤重量(W<sub>s</sub>)を測定する。IPN の W<sub>s</sub> と W<sub>a</sub> から次式に従って、膨潤度(S)を求めた。 $S = W_s / W_a$

## 3. 結果と考察

### 3.1 温度と pH の変化に対応するコポリマーの合成

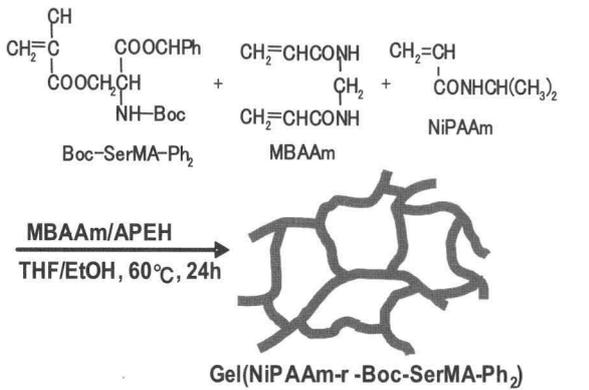
水中で外部刺激にตอบสนองして可逆的に収縮-膨潤するポリマーヒドロゲルは DDS のキャリアー分子やティッシュエンジニアリングにおける細胞培養基材などに応用できる。しかし、ヒドロゲル自体は強度に欠けるので実用化には課題が残る。そのため、適度な強度があり、弾力性を示す IPN ヒドロゲルが検討されている。本論文では、異なる 2 種の外部刺激-温度と pH の変化-にそれぞれตอบสนองする IPN ゲルを合成した。温度応答性ポリマー poly(NiPAAm) は、32°C を境に低温側では膨潤し、高温側では収縮する。このセンサーを利用した例が DDS である。DDS は抗がん剤を組み込むキャリアー分子として IPN ヒドロゲルを用い、抗がん剤を必要な時に、必要な量を、必要な部位で放出できるように設計された 21 世紀型の医薬投与システムである。このとき、抗がん剤の放出原理は、ガン部位は他の組織より温度が高いのでキャリアー分子はガン部位に集積して温度差で収縮し、抗がん剤を絞り出し効果によって徐放することにある<sup>28,29</sup>。一方、IPN ヒドロゲルフィルムをティッシュエンジニアリングにおける細胞培養基材として用いた場合は、先ず、高温側(疎水性)で皮膚細胞を播種・培養する。必要な大きさになった皮膚組織は低温にすると IPN ヒドロゲルが膨潤して親水性となるので細胞

を傷つけることなく皮膚シートを培養基材(培地)から採取できる。また、両性イオン構造を含む水溶性のアミノ酸ポリマーは等電点付近で収縮し、それより酸性側あるいはアルカリ性側ではイオン反発のため膨潤するので温度応答性ポリマーと同様に pH 変化に対して応答して可逆的に膨潤-収縮する。以上のことから、2種のセンサー機能を有するポリマーセグメントからなる IPN ヒドロゲルは新規な生医学材料として応用展開が期待できる。

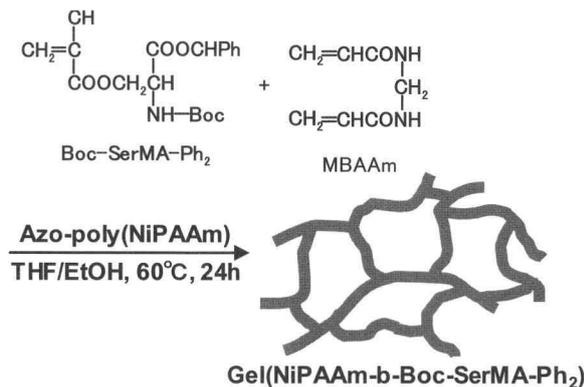
本報では、poly(NiPAAm)セグメントと poly(Boc-SerMA-Ph<sub>2</sub>)セグメントからなるコポリマーゲルを架橋剤 MBAAm 存在下、ラジカル重合して板状のランダムコポリマー型ヒドロゲル Gel(NiPAAm-r-Boc-SerMA-Ph<sub>2</sub>)を得た。また、アゾ基の両側に poly(NiPAAm)セグメントをもつポリマーアゾ開始剤 Azo-poly(NiPAAm)を用いて MBAAm 存在下、Boc-SerMA-Ph<sub>2</sub>のラジカル重合を行い、板状のブロックコポリマー型ヒドロゲル Gel(NiPAAm-b-Boc-SerMA-Ph<sub>2</sub>)を得た。合成経路を Scheme 1 と Scheme 2 に示す。ここに、ポリマーアゾ開始剤の原料となる分子末端に OH 基を有する poly(NiPAAm)-OH の分子量が Mn = 3.5 × 10<sup>3</sup> であり、Azo-poly(NiPAAm)の分子量が Mn =

7.0 × 10<sup>3</sup> であったことはポリマー開始剤の構造を反映している。Azo-poly(NiPAAm)水溶液の LCST は 33°C であったので、poly(NiPAAm)セグメントを含むコポリマーは LCST 付近で相変化、即ち、低温側(親水性：膨潤)⇔高温側(疎水性：収縮)する。

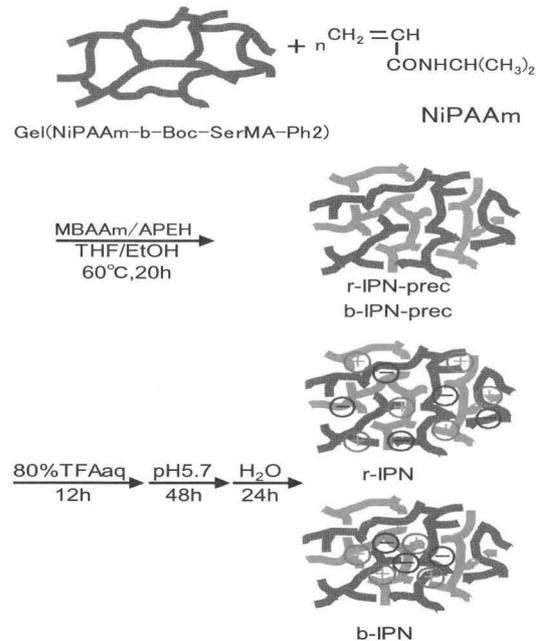
3.2 温度と pH の変化に対応する IPN ヒドロゲルの合成  
Gel(NiPAAm-r-Boc-SerMA-Ph<sub>2</sub>) あるいは Gel(NiPAAm-b-Boc-SerMA-Ph<sub>2</sub>)、MBAAm の存在下、MAIB を開始剤として NiPAAm のラジカル重合を行い、それぞれ板状のランダムコポリマー型 IPN 前駆体(r-IPN-prec)とブロックコポリマー型 IPN 前駆体(b-IPN-prec)を得た。ついで r-IPN-prec および b-IPN-prec を 80%トリフルオロ酢酸で加水分解すると脱保護基反応が進行し、それぞれランダムコポリマー型 IPN(r-IPN ヒドロゲル)とブロックコポリマー型 IPN(b-IPN ヒドロゲル)を得た。反応経路を Scheme3 に示す。



Scheme 1 Preparation of hydrogel composed of random copolymer precursor.

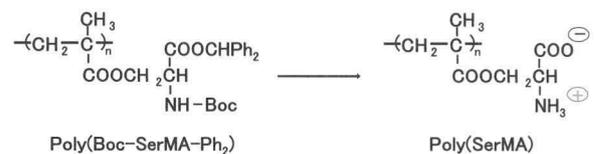


Scheme 2 Preparation of hydrogel composed of block copolymer precursor.



Scheme3 Preparation of IPN hydrogel.

なお、Poly(Boc-SerMA-Ph<sub>2</sub>)セグメントは次のように保護基が離脱し poly(SerMA)セグメントとなる。



### 3.3 温度および pH 変化による IPN ヒドロゲルの膨潤-収縮挙動

IPN ヒドロゲルの膨潤-収縮に及ぼす温度変化の影響は、 $20^{\circ}\text{C}$ ~ $40^{\circ}\text{C}$ の温度範囲で検討した。また、同時に酸性(pH4.5)、塩基性(pH8)および両性イオン構造セリン基の等電点(pH5.7)の3種類のリン酸バッファー溶液を用い、体積変化に及ぼす pH 変化も確認した。r-IPN の温度と pH 変化に及ぼす膨潤-収縮挙動を Fig.1 に示す。IPN を所定

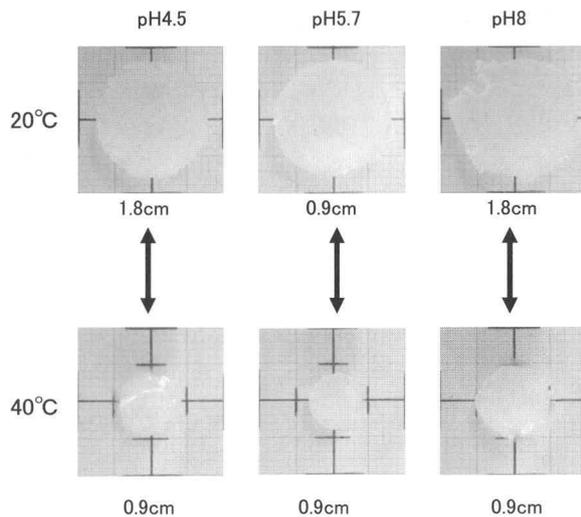


Fig.1 Photograph of the swelling-shrinking behavior of r-IPN hydrogel.

温度、所定 pH バッファー溶液中 24h 静置した結果、 $20^{\circ}\text{C}$ と  $40^{\circ}\text{C}$ の場合を比較すると明らかに前者の場合が膨潤していることがわかる。また、 $20^{\circ}\text{C}$ と  $40^{\circ}\text{C}$ のいずれの場合も、セリン基の等電点付近で IPN は最も収縮することがわかる。r-IPN ヒドロゲルと b-IPN ヒドロゲルをそれぞれバッファー溶液(pH4.5, pH5.7, pH8)に入れ、 $20^{\circ}\text{C}$ 、膨潤平衡に達する 24h までの所定時間ごとに湿潤重量(Ws)を測定した。ついで  $40^{\circ}\text{C}$ 、完全に収縮する 24h までの所定時間ごとに湿潤重量(Ws)を測定した。IPN ヒドロゲルはシャープに膨潤-収縮を繰り返した。結果を Fig.2 と Fig.3 に示す。IPN ゲルの温度変化にตอบสนองする可逆的な膨潤-収縮変化は次のように説明される。LCST( $32^{\circ}\text{C}$ )以下では PNiPAAm セグメントの側鎖アミド基に由来する水素結合が発達して水和によって多数の水分子を保持するので膨潤する。一方、LCST( $32^{\circ}\text{C}$ )以上では、PNiPAAm セグメントは熱による分子運動が活発となり、水素結合は切断され、側鎖アミド基は親水性を失うので PNiPAAm セグメントは疎水性となり、IPN は収縮・白濁する。

一方、poly(SerMA) セグメントの側鎖である両性イオン構造のセリン基は酸性で正電荷、アルカリ性では負電荷となるので静電反発が重要となり、水和が発達して分子鎖が広がり膨潤する。等電点付近では中性のイオン化状態とな

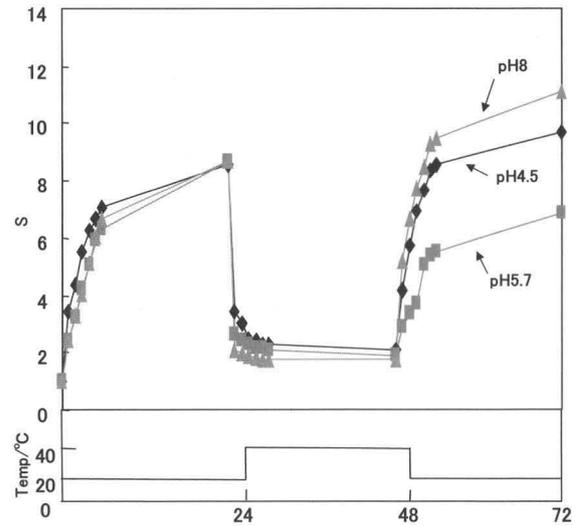


Fig.2 Effect of temperature and pH on the swelling-shrinking behavior of r-IPN.

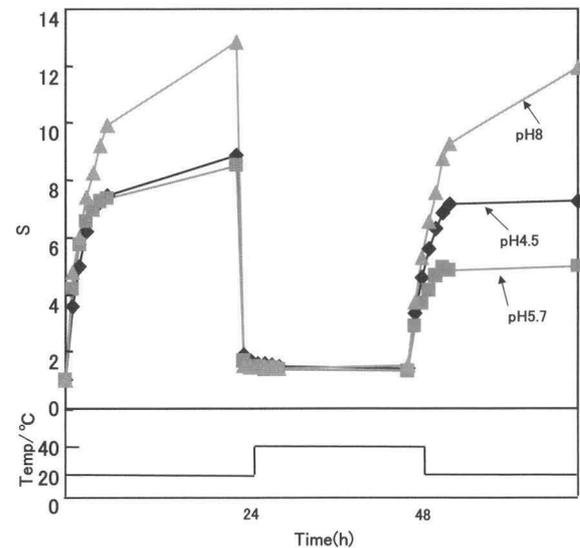


Fig.3 Effect of temperature and pH on the swelling-shrinking behavior of b-IPN.

るため水和は減少し、分子鎖は収縮する。この pH 変化による膨潤-収縮な変化は Fig.2 と Fig.3 に示すように、セリン基の等電点 pH5.7 で膨潤の程度は少なく、膨潤度は  $\text{pH}5.7 < \text{pH}4.5 < \text{pH}8$  となる。このように環境の温度変化と pH 変化によって連続的に膨潤-収縮を制御できるため本 IPN ゲルは各種医用工学材料としての応用展開が期待できる。

#### 4. 参考文献

- 1) P. S. Stayton, T. Shimoboji, C. Long, A. Chikoti, G. Chen, J. M. Harris, A. S. Hoffman, *Nature*, **378**, 472(1995).
- 2) L.-Y. Chu, Y. Li, J.-H. Zhu, W.-M. Chen, *Angew. Chem.*

- Int. Ed.*, **44**, 2124(2005).
- 3) D. H. Huber, R. P. Manginell, M. A. Samara, B.-I. Kim, B. C. Bunker, *Science*, **301**, 352(2003).
  - 4) H. G. Schild, D. A. Tilleh, *J. Phys. Chem.*, **94**, 4352(1990).
  - 5) Y. Maeda, T. Higuchi, I. Ikeda, *Langmuir*, **16**, 7503(2000).
  - 6) Y. Ono, T. Shikata, *J. Amer. Chem. Soc.*, **128**, 10030(2006).
  - 7) J. S. Scarpa, D. D. Mueller, I. M. Klotz, *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 6024(1967).
  - 8) K. Sugiyama, S. Mitsuno, Y. Yasufuku, K. Shiraishi, *Chem. Lett.*, 219(1997).
  - 9) K. Sugiyama, S. Mitsuno, Y. Yasufuku, K. Shiraishi, *Chem., Lettr.*, 1997, 219.
  - 10) 谷川将行, 白石浩平, 杉山一男, *材料*, **55**, 391(2006).
  - 11) 白石浩平, 大段 恵, 前田和磨, 杉山一男, 鈴木克之, 細谷浩史, *高分子論文集*, **33**, 613(2006).
  - 12) 白石浩平, 繁定哲行, 山本和彦, 杉山一男, *高分子論文集*, **65**, 132(2008).
  - 13) H. Kanazawa, K. Yamamoto, Y. Kashiwase, Y. Matsushima, N. Takai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15**, 1514(1997).
  - 14) K. Sugiyama, R. Hanamura, M. Sugiyama, *J. Polym. Sci.:Part A: Polym. Chem.*, **38**, 3369(2000).
  - 15) 白石浩平, 大段恵, 前田和磨, 杉山一男, 鈴木克之, 細谷浩史, *高分子論文集*, **63**, 613(2006).
  - 16) T. Okano, N. Yamada, H. Sakai, Y. Sakurai, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1243(1993).
  - 17) Y. Yamato, C. Konno, A. Kushida, M. Hirose, M. Utsumi, A. Kikuchi, T. Okano, *Biomaterials*, **21**, 981(2000).
  - 18) H. A. Recum, S. w. Kim, A. Kikuchi, M. Okuhara, Y. Sakurai, T. Okano, *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, 631(1998).
  - 19) 白石浩平, 三浦浩二, 浅見 剛, 光田益士, 杉山一男, *高分子論文集*, **60**, 30, (2003).
  - 20) T. MAEDA, M. Takenouchi, K. Yamamoto, T. Aoyagi, *Polym. J.*, **41**, 181(2009).
  - 21) C. S. Brazel, N. A. Peppas, *Macromolecules*, **28**, 8016(1995).
  - 22) 木村隆夫, 高橋芳夫, 今井伸治, *高分子論文集*, **61**, 371(2004).
  - 23) Y. Ling, M. Lu, *Polym. J.* **40**, 592(2008).
  - 24) 島田善彦, 遊佐真一, 山本統平, 森島洋太郎, *高分子論文集*, **64**, 992(2007).
  - 25) S. Hasegawa, H. Ohashi, Y. Maekawa, R. Katakai, M. Yosida, *Polym. J.*, **41**, 533(2009).
  - 26) K. Sugiyama, K. Sono, *J. Appl. Polym. Sci.*, **81**, 3056(2001).
  - 27) K. Sugiyama, K. Shiraishi, K. Sono, *J. Appl. Polym. Sci.*, **90**, 143(2003).
  - 28) H. Katano, K. Sanui, N. Ogata, T. Okano, Y. Sakurai, *Polym. J.* **23**, 1179(1991).
  - 29) K. Mukae, Y. H. Bae, T. Okano, S. W. Kim, *Polym. J.* **22**, 250(1990).
  - 30) K. Shiraishi, T. Ohnishi, K. Sugiyama, K. Okada and O. Matsuo, *Chem. Lett.*, 1997, 863(1997)
  - 31) J.B. Miller, *J. Amer. Chem. Soc.*, **24**, 560(1959).
  - 32) 白石浩平, 三浦浩二, 浅見剛, 光田益士, 杉山一男, *高分子論文集*, **60**, 30(2003).