

フェニルボロン酸導入グルコース応答性ゲル
に関する研究

小島 裕

目次

略語一覧	・・・1
総論の部	
緒言	・・・3
第1章 両末端フェニルボロン酸修飾ポリエチレングリコール (PBA-PEG) の刺激応答性材料としての評価	・・・6
第1節 PBA-PEG とポリビニルアルコール (PVA) のゲル形成とそのグルコース応答性	・・・6
第2節 PBA-PEG とシクロデキストリン (CyD) の組み合わせによる刺激応答性	・・・12
第3節 小括	・・・19
第2章 主鎖中に PBA を修飾したアクリルアミドゲルの調製とグルコース応答性	・・・20
第1節 架橋剤の合成	・・・21
第2節 ビニル化 PEG を用いたゲルの調製とそのグルコース応答性	・・・23
第1項 グルコースに応答して膨潤するゲル	・・・23
第2項 グルコースに応答して収縮するゲル	・・・27
第3項 グルコースメーターとゲルバルブの作製	・・・33

第3節 架橋部位にロタキサン (RX) 構造を持つように設計したゲルの調製	・・・37
第4節 小括	・・・40
第3章 架橋点に PBA を修飾したスライドリングゲル (PBA-SRgel) の調製とグルコース応答性	・・・41
第1節 刺激に応答して膨潤するゲルの調製とそのグルコース応答性	・・・41
第2節 PBA-SRgel の機械的性質の評価	・・・44
第3節 小括	・・・46
第4章 架橋部分がスライドして伸縮するゲルの調製とグルコース応答性	・・・47
第1節 架橋部分にヘテロ修飾 PEG と γ -CyD からなるロタキサン(RX) 構造を有するゲルの調製とそのグルコース応答性	・・・47
第2節 架橋部分にポリロタキサン(PRX) 構造を有するゲルの調製とそのグルコース応答性	・・・52
第3節 小括	・・・59
結論	・・・60
謝辞	・・・62
実験の部	・・・63
参考文献	・・・75

略語一覧

本論文中では、以下に示す記号を略語として用いた。

AAm	Acrylamide
3-AAmPBA	3-Acrylamidophenylboronic acid
AIBN	Azobis(isobutyronitrile)
APS	Ammonium persulfate
CHES	<i>N</i> -Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid
CyD	Cyclodextrin
DMAPAAm	<i>N,N</i> -Dimethylaminopropylacrylamide
DSC	Differential scanning calorimetry
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
PBA	Phenylboronic acid
PBA-DMAP-PAAm-PEGgel	Phenylboronic acid and dimethylaminopropyl-modified polyacrylamide polyethylene glycol-crosslinked gel
PBA-DMAP-PAAm-PRXgel	Phenylboronic acid and dimethylaminopropyl-modified polyacrylamide polyrotaxane-crosslinked gel
PBA-DMAP-PAAm-RXgel	Phenylboronic acid and dimethylaminopropyl-modified polyacrylamide rotaxane-crosslinked gel
PBA-PAAm-MIXgel	Phenylboronic acid-modified polyacrylamide mix-crosslinked gel
PBA-PAAm-PEGgel	Phenylboronic acid-modified polyacrylamide polyethylene glycol-crosslinked gel

PBA-PAAm-PRXgel	Phenylboronic acid-modified polyacrylamide polyrotaxane-crosslinked gel
PBA-PAAm-RXgel	Phenylboronic acid-modified polyacrylamide rotaxane-crosslinked gel
PBA-PEG	Phenylboronic acid-modified polyethylene glycol
PBA-PEG-PVAgel	Phenylboronic acid-modified polyethylene glycol polyvinyl alcohol gel
PBA-SRgel	Phenylboronic acid-modified slide-ring gel
PE	Pentaerythritol
PEG	Polyethylene glycol
PEC-COOH	PEG-arboxylic acid
p(P)RX	Psuedo(poly)rotaxane
PRX	Polyrotaxane
PVA	Polyvinyl alcohol
PXRD	Powder X-ray diffraction
RX	Rotaxane
SRgel	Slide-ring gel
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl free radical

総論の部

緒言

機械 (マシン) は、外力に抵抗し得る物体の結合からなり、一定の相對運動をなし、外部から与えられたエネルギーを有用な仕事に変形するもの¹⁾と定義されており、身の回りにあるマシンの例を挙げると、エンジンやモーターがある。これらのマシンは、ほとんどが金属や無機化合物から構成されている。一方、医療分野において、生体適合性の観点から有機化合物で構成されるマシンが望まれ、盛んに研究が行われている。有機化合物のみからなるマシンの構成要素の一つとして、刺激応答性ゲルがある。

ゲルとは、溶媒に不溶の三次元網目構造を持つ高分子およびその膨潤体と定義される²⁾。このゲルに刺激応答性分子を修飾したものを刺激応答性ゲルという。これは、熱・電気・光・pH変化・特定分子の存在などの外界の情報を感知して応答する分子マシンとして機能する³⁻¹⁷⁾。例えば、刺激に応答して崩壊するマシン、刺激に応答して膨潤するマシン、あるいは、刺激に応答して収縮するマシンが挙げられる (Fig. 1)。

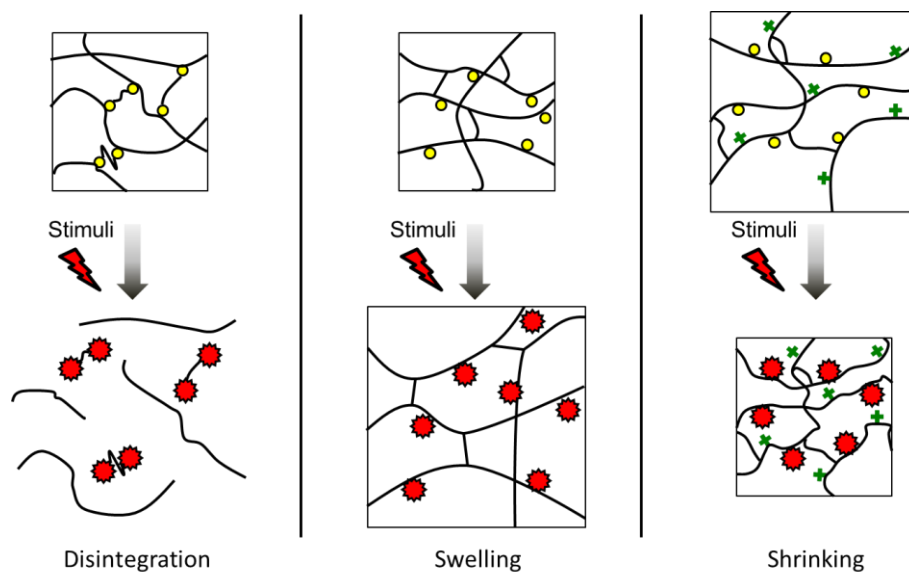


Fig. 1. Disintegration, swelling and shrinking of a stimuli-responsive machines.

本研究では、生体内におけるグルコースの濃度変化といった刺激を感知する分子マシンとして、グルコース応答性のゲルに着目した。ゲルにグルコース応答性を持たせるために、糖応答性分子であるフェニルボロン酸 (PBA) を用いた。PBA は、糖を含めたポリオール構造を有する化合物と可逆的にエステル結合を形成し、負電荷を帯びる性質を持つ (Fig. 2)。この PBA を、ゲルを構成する高分子鎖の末端に、ゲルの主鎖構造中に、または、ゲルの架橋点に、導入することで刺激応答性ゲルとして機能することが期待できる (Fig. 3)。

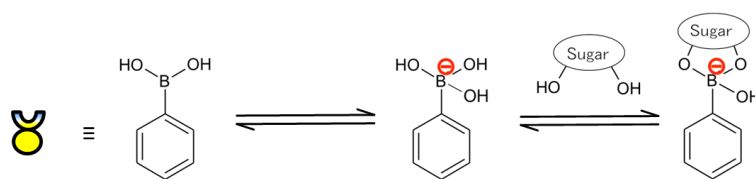


Fig. 2. Equilibrium between sugar and PBA.

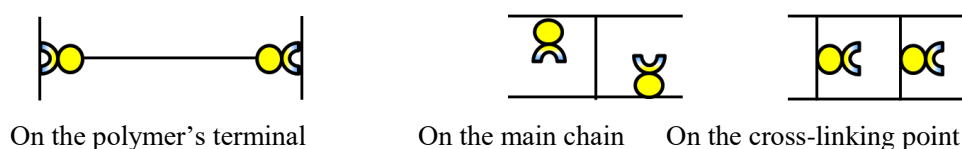


Fig. 3. Schematic representations of introducing moieties of PBA.

シクロデキストリン (CyD) は、グルコースが連なった環状オリゴ糖である。CyD の持つ空孔には、化合物を包接することができる。包接される分子は、低分子のみならず、ポリエチレングリコール (PEG) などの高分子もあり、ロタキサン (RX) やポリロタキサン (PRX) を形成する¹⁸⁻²⁴⁾ (Fig. 4)。これらを構成する環状分子と線状分子との間には化学的な結合が存在しないため、環状分子は線状分子上で回転したり、線状分子に沿ってスライドすることができる特徴を持つ。また末端にかさ高い基を有さないシュード (ポリ) ロタキサン (p(P)RX) の場合、スライドにより可逆的な崩壊と再形成が生じ得る。このような構造をゲルに組み込むことにより、ゲルの高機能化が期待できる。

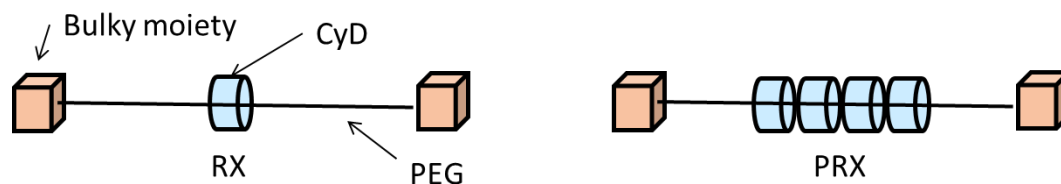


Fig. 4. Schematic representations of rotaxane and polyrotaxane.

本研究では、ゲル網目構造の各部位にフェニルボロン酸を導入することで分子マシンとして機能するグルコース応答性ゲルを調製した。さらにシクロデキストリンを組み合わせることでそのゲルの高機能化を試みた。

このようなグルコースに応答して反応するゲルを組み込んだ分子マシンは、血糖センサーや糖尿病の治療への応用が期待できる。

第1章 両末端 PBA 修飾ポリエチレングリコール (PBA-PEG) の刺激応答性材料としての評価

第1章では、高分子の末端に PBA を導入し、これを用いて刺激応答性材料の調製を試みた結果を記述する (Fig. 5)。高分子には CyD と組み合わせることを考え、PEG を用いた。両末端に PBA を持つ PEG を架橋剤や主鎖分子として用いることによって刺激に応答して崩壊する材料が調製できることが考えられる。

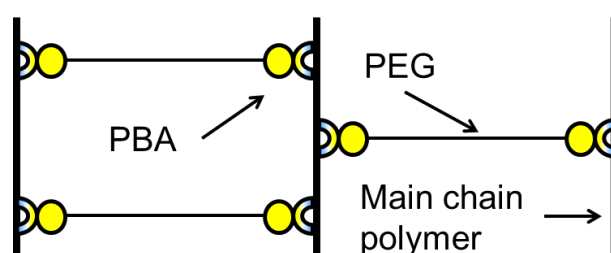


Fig. 5. Schematic representation of the gel using the PBA terminal polymer.

第1節 PBA-PEG とポリビニルアルコール (PVA) のゲル形成とそのグルコース応答性

ゲルの主鎖分子には、ヒドロキシ基を多くもつ PVA を用いた。PVA とホウ酸や低分子のジボロン酸を用いてゲルが形成されることが報告されている^{25, 26)}。これらの報告では、ホウ酸やジボロン酸が PVA の持つジオール構造と結合し、PVA 鎖を架橋しゲルが生じる。高分子の両末端に PBA を導入した PBA-PEG においても、PBA-PEG が PVA 鎖を架橋することで、糖に応答して崩壊するゲル (PBA-PEG-PVAgel) が調製できると考えた (Fig. 6)。

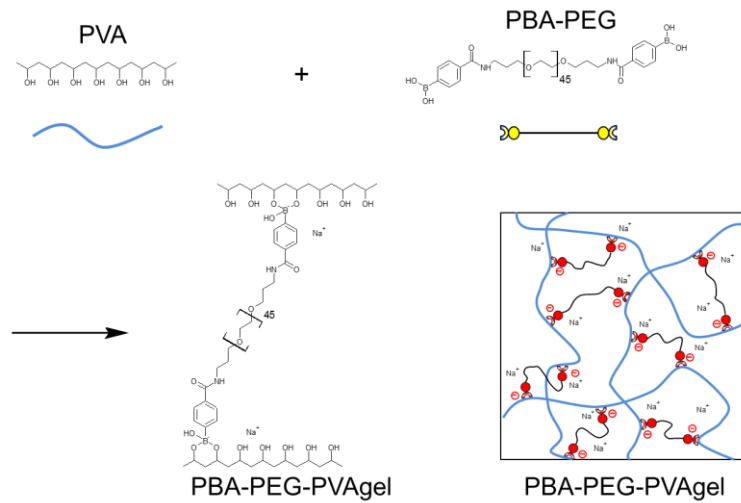
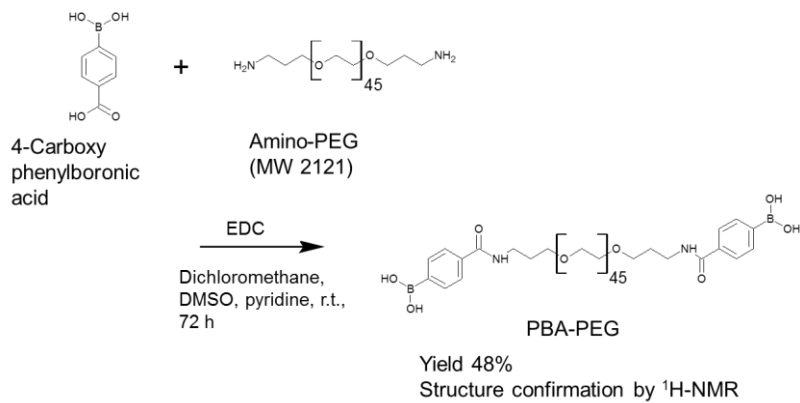


Fig. 6. Chemical structure and schematic representation of PBA-PEG-PVAgel.

両末端にアミノ基が導入された PEG (Amino-PEG) と 4 位にカルボキシル基を持つ 4-carboxyphenylboronic acid を 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) を用いて反応させ、両末端に PBA を持つ PBA-PEG を得た²⁷⁾ (Scheme 1)。¹H-NMR より算出した末端修飾率は、85%であった。試薬の試験成績書によると使用した Amino-PEG の末端活性化率は 90%であり、ほとんどのアミノ基は、PBA に修飾されたと考えられる。



Scheme 1. Preparation of PBA-PEG.

PVA (重合度 2000) 水溶液と PBA-PEG 水溶液を混合し、そこに少量の NaOH 水溶液を添加することでゲル化し、PBA-PEG-PVAgel が得られた (Fig. 8)。PBA は、自身のもつボロン酸部位に水酸化物イオンが配位することでポリオール構造との結合性が上昇することが知られている²⁸⁾。したがって、PBA-PEG-PVAgel の形成メカニズムは、塩基性条件下で PBA 部位に水酸化物イオンが配位し、PBA のポリオール結合能が高まり、PBA-PEG が PVA 鎖を架橋することであると考えられる (Fig. 9)。

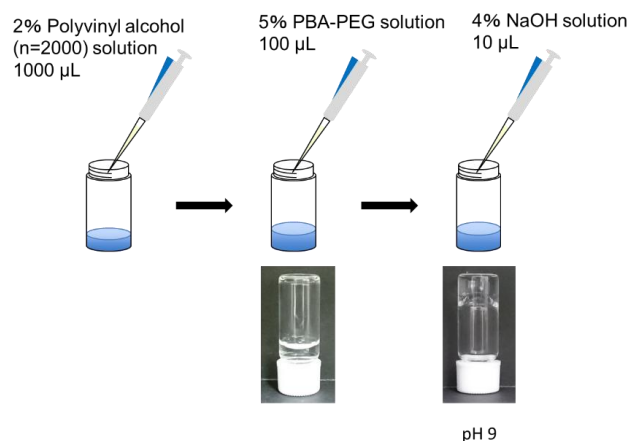


Fig. 8. Schematic representation of preparation of PBA-PEG-PVAgel.

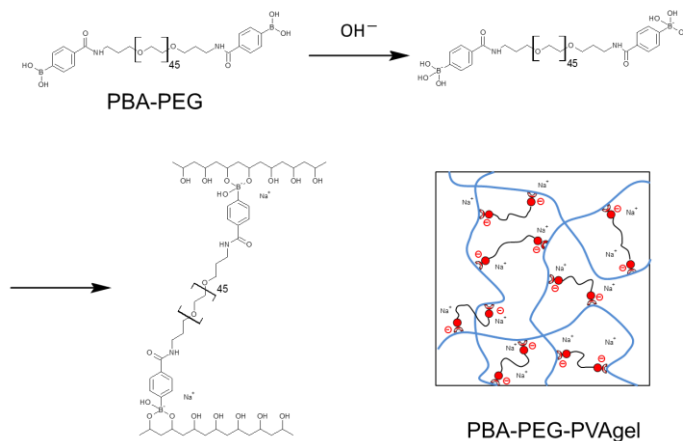


Fig. 9. Mechanism for gelation of PBA-PEG-PVAgel.

Figure 10 に回転粘度計を用いたレオグラムの結果を示した。このグラフの横軸は、ずり速度で、縦軸は、ずり応力であり、このグラフの傾きが粘度に相当する。凡例中に記載してある UP は、回転速度を上昇させた時の結果で、DOWN は、回転速度を減少させたときの結果である。PVA のみで測定したレオグラムでは、低い粘度であったのに対し、PBA-PEG-PVAgel のレオグラムは、明らかに高い粘度を示した。また、PBA-PEG-PVAgel は、降伏値が確認されず、準粘性流動を示した (Fig. 10a)。比較対象として、アルギン酸カルシウム gel を用いた。比較するために、ずり速度が 0.8 s^{-1} のときに同程度の粘度を示すようにアルギン酸と塩化カルシウムからなるアルギン酸カルシウム gel を調製した。アルギン酸ナトリウム溶液では、低い粘度を示したが、塩化カルシウム溶液を添加することで、2 価の陽イオンである Ca^{2+} によりアルギン酸が架橋され、明らかに粘度が上昇した。アルギン酸カルシウム gel は、応力に降伏値を持っており、準塑性流動に近いレオグラムを示した (Fig. 10b)。このことから、PEG-PBA-PVAgel では、あるずり速度でひずみを加えている時にゲル内の架橋構造の破壊と再生が同時に生じていることが考えられる。

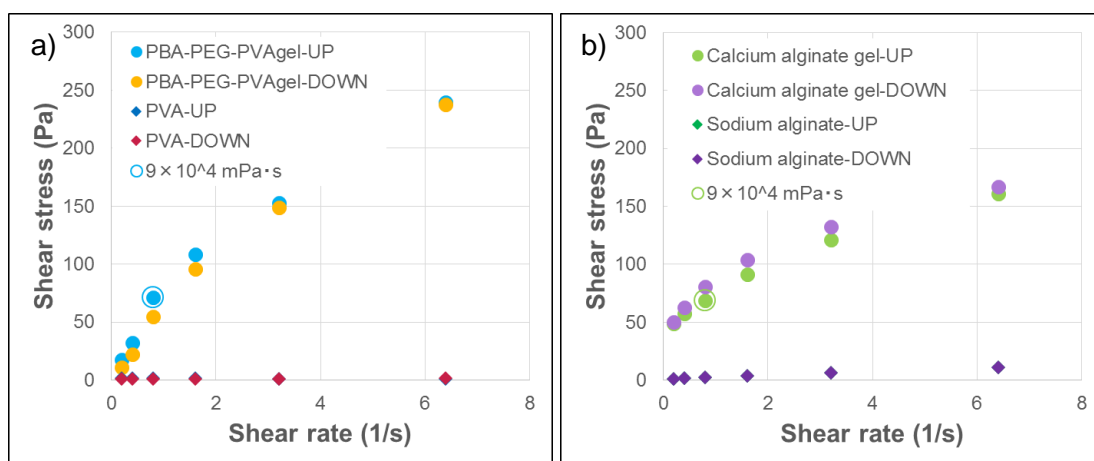


Fig. 10. Rheograms of gels and polymer solutions. a) PBA-PEG-PVAgel and PVA, b) Calcium alginate gel and Sodium alginate.

PBA-PEG-PVAgel がグルコースに反応して崩壊するかを評価するために、ゲルに最終濃度が 2% になるようにグルコースを添加した (Fig. 11)。PBA-PEG-PVAgel にグルコースを添加することによって、粘性が低下した。回転粘度計を用いて粘度を測定した結果、明らかに粘度が低下し、PVA のみのレオグラムと同様の粘性を示した (Fig. 12)。すなわち、グルコースを添加することによって、PVA とグルコースが競合し、ゲルの網目構造を形成する PVA と PBA-PEG との結合が切断されたと考えられる。その結果として、ゲルは、崩壊したと考えられる (Fig. 13)。

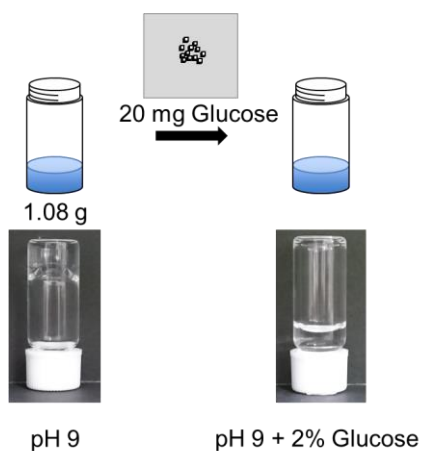


Fig. 11. Schematic representation of method of glucose response of PBA-PEG-PVAgel.

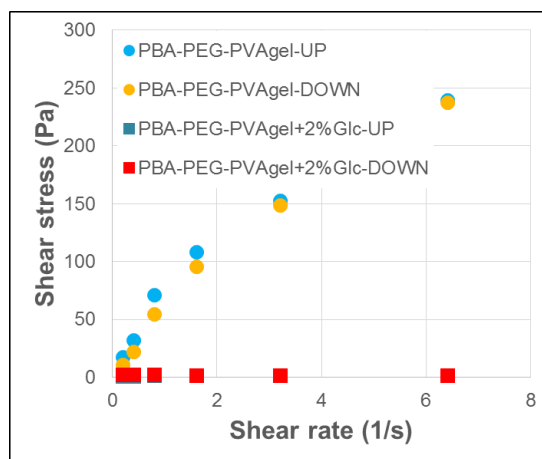


Fig. 12. Rheograms of PBA-PEG-PVAgel with and without 2% glucose.

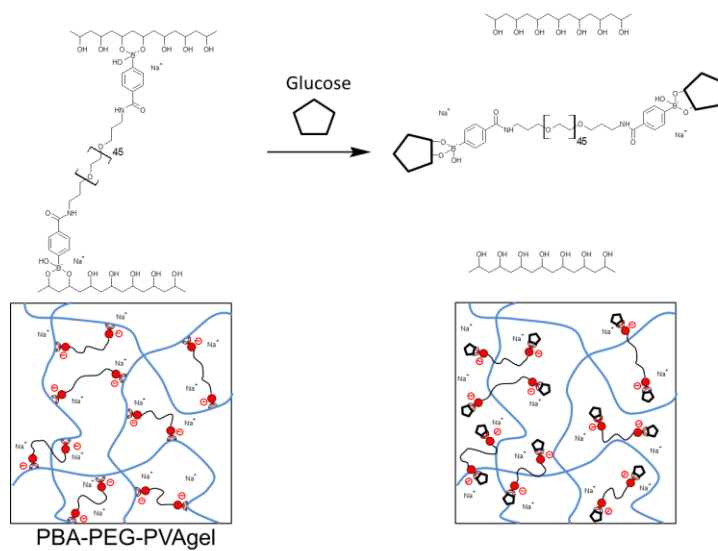


Fig. 13. Mechanism for glucose-induced disintegration of PBA-PEG-PVAgel.

第2節 PBA-PEG と CyD の組み合わせによる刺激応答性

末端が修飾されていない PEG は、 α -CyD や γ -CyD と 1 本鎖または 2 本鎖のシユードポリロタキサン (pPRX) を形成することが知られている^{18, 29)}。PBA-PEG においても、PBA-PEG と CyD とを組み合わせることにより、1 本鎖および 2 本鎖の pPRX の形成が期待できる (Fig. 14)。また CyD は高い水素結合能を有するため、pPRX を構成する CyD 同士が水素結合を形成してゲルの架橋点になることも期待できる³⁰⁻³²⁾。

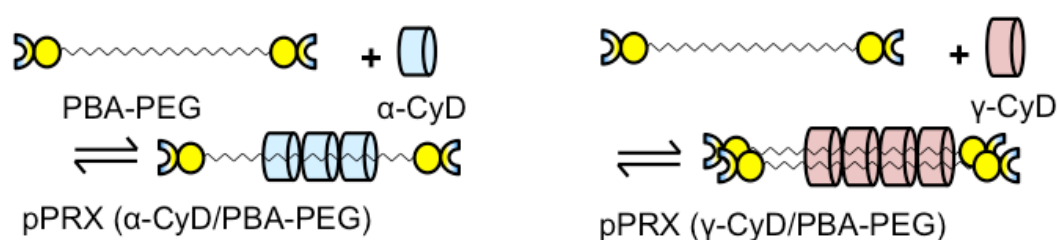


Fig. 14. Schematic representations of the formation of the pPRX(α -CyD/PBA-PEG) and the pPRX(γ -CyD/PBA-PEG).



Fig. 15. Schematic representations of the cross-link points by interaction between CyDs of the pPRX(α -CyD/PBA-PEG) and the pPRX(γ -CyD/PBA-PEG)..

本節では、PBA-PEG を用いた pPRX の形成とその特性を評価し、更にこの pPRX を低分子ポリオールであるペンタエリスリトール (PE) で繋いで主鎖を伸ばすことによってゲルの調製を試みた結果を記述する (Fig. 16)。

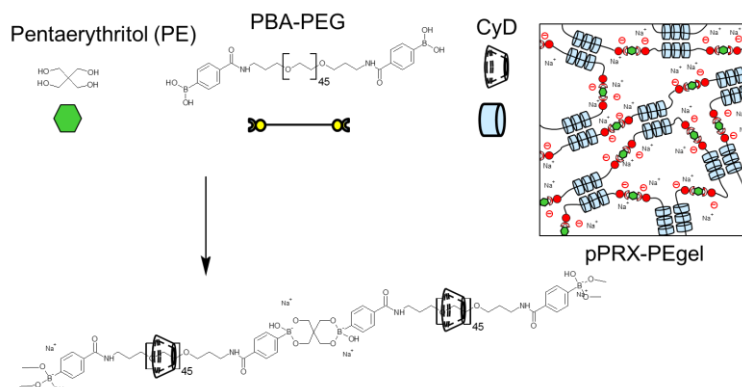


Fig. 16. Chemical structure and schematic representation of pPRX(CyD/PBA-PEG)-PEgel.

まず、pPRX の調製を行った。水中で PBA-PEG と CyD を共存させることで沈殿が生じた (Fig 17)。この沈殿を回収し、固体を得た。得られた固体の収量および $^1\text{H-NMR}$ より算出した被覆率は、Table 1 に示す。ここでいう被覆率とは、PEG 鎖上を CyD がどの程度覆っているかの尺度である。pPRX(α -CyD/PBA-PEG) の被覆率は、未修飾の PEG を用いた pPRX と比較して低かった³³⁾。これは、PBA 末端が大きいため被覆率が低くなったと考えられる³⁴⁾。

得られた固体が、pPRX を形成しているかどうかを示差走査熱量測定 (DSC, Fig. 18) および粉末 X 線回折測定 (PXRD, Fig. 19) を用いて評価した。

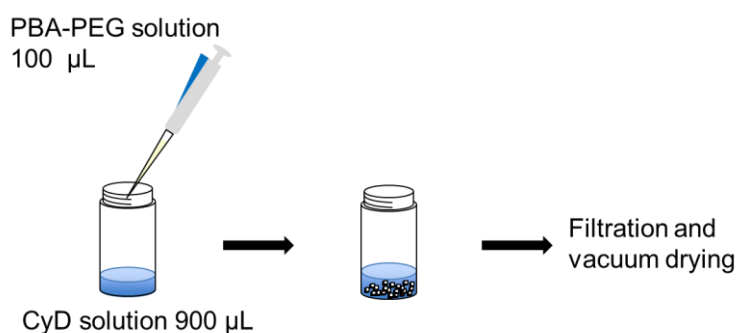


Fig. 17. Schematic representation of preparation of pPRXs.

Table 1. Yields and coverages of pPRXs.

	PBA-PEG (mg)	CyD (mg)	Yield (mg)	Coverage (%)
pPRX (α -CyD/PBA-PEG)	13.3	120	39.4	63
pPRX (γ -CyD/PBA-PEG)	33.9	200	199	87

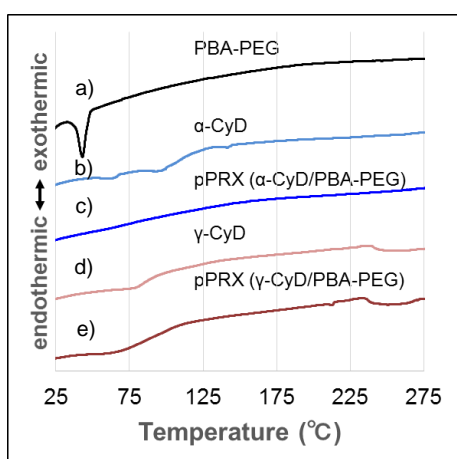


Fig. 18. DSC thermograms: (a) PBA-PEG, (b) α -CyD, (c) pPRX(α -CyD/PBA-PEG), (d) γ -CyD, (e) pPRX(γ -CyD/PBA-PEG).

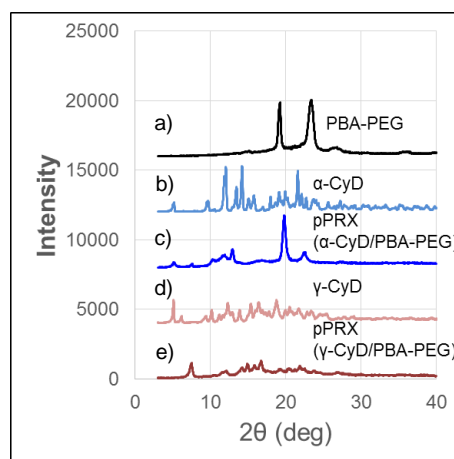


Fig. 19. PXRD patterns: (a) PBA-PEG, (b) α -CyD, (c) pPRX(α -CyD/PBA-PEG), (d) γ -CyD, (e) pPRX(γ -CyD/PBA-PEG)..

PBA-PEG 単独のサーモグラムにおいて、43°Cに吸熱ピークが観察された (Fig. 18a)。これは、PBA-PEG の融点に由来すると考えられる。PBA-PEG と α -CyD を水中で共存させることで得られた固体のサーモグラムにおいては、吸熱ピークが完全に消失した (Fig. 18c)。これは、 α -CyD によって PBA-PEG の結晶構造がなくなったことを示す。したがって、PBA-PEG と α -CyD からなる pPRX を形成したと考えられる。同様に、PBA-PEG と γ -CyD を水中で共存させることで得られた固体においても吸熱ピークは見られず、PBA-PEG と γ -CyD からなる pPRX を形成したと考えられる (Fig. 18e)。PXRD において、PBA-PEG と α -CyD を水中で共存させることで得られた固体は、未修飾 PEG と α -CyD からなる pPRX の六方晶系チャンネル型構造の回折パターンとよく似た回折パターンを示した (Fig. 19c)^{35,36}。式 1 を用いて観測された各回折線の格子面間隔 d_{obs} を算出した。結晶が六方晶系であると仮定し、式 2 より結晶面 (hkl=200) の回折線 ($2\theta=7.5^\circ$) から格子定数 a と b を、結晶面 (hkl=002) の回折線 ($2\theta=11.9^\circ$) から格子定数 c を算出した。これらの格子定数を用いて式 2 から予測された格子面間隔 d_{cal} を算出した。観測された各回折線の d_{obs} は d_{cal} とよく一致した (Table 2)。これは、多数の α -CyD が PBA-PEG を包接した、六方晶系チャンネル型構造の形成を支持するものと考えられる。PBA-PEG と γ -CyD を水中で共存させることで得られた固体は、未修飾 PEG と γ -CyD からなる pPRX の正方晶系チャンネル型構造の回折パターンとよく似た回折パターンを示した (Fig. 19e)³⁶。結晶が正方晶系であると仮定し、式 1 と式 3 を用いて結晶面 (hkl=200) の回折線 ($2\theta=7.5^\circ$) から格子定数 a と b を、結晶面 (hkl=002) の回折線 ($2\theta=12.1^\circ$) から格子定数 c を算出した。これらの格子定数を用いて式 3 から予測された格子面間隔 d_{cal} を算出した。観測されたそれぞれの回折線の d_{obs} は d_{cal} とよく一致した (Table 3)。これは、多数の γ -CyD が PBA-PEG を包接した、正方晶系チャンネル型構造の形成を支持するものと考えられる。

DSC、PXRD、¹H-NMR の結果から、得られた固体は pPRX を形成していると考えられる。

$$2d \sin \theta = \lambda \quad (1)$$

$$d_{hkl} = \frac{1}{\sqrt{\frac{4}{3} \frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2}}} \quad (2)$$

$$d_{hkl} = \frac{1}{\sqrt{\frac{h^2 + k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2}}} \quad (3)$$

Table 2. Crystallographic characteristics of pPRX(α -CyD/PBA-PEG).

$2\theta_{\text{obs}}$ (deg)	(hkl)	d_{obs} (Å)	d_{cal} (Å) ^a
7.48	(200)	11.81	11.81
11.88	(002)	7.44	7.44
12.90	(220)	6.86	6.82
19.80	(420)	4.48	4.46
22.56	(600)	3.94	3.94

^aCalculated assumig a hexagonal unit cell with a=b=27.27 Å, c=14.89 Å

Table 3. Crystallographic characteristics of pPRX(γ -CyD/PBA-PEG).

$2\theta_{\text{obs}}$ (deg)	(hkl)	d_{obs} (Å)	d_{cal} (Å) ^a
7.46	(200)	11.84	11.84
12.08	(002)	7.32	7.32
14.90	(400)	5.94	5.92
16.72	(420)	5.30	5.30
21.84	(530)	4.07	4.06

^aCalculated assumig a tetragonal unit cell with a=b=23.68 Å, c=14.64 Å

得られた pPRX の刺激応答性を評価するために、2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) 緩衝液 (20 mM, 2.0 mL, pH 7.4) にそれぞれの pPRX を吸光度 (測定波長 : 700 nm) が約 2 になるように懸濁させた。この時の吸光度を濁度 100% とし、この懸濁液にジオール化合物 (グルコースまたはカテコール) を添加した際の濁度の変化を評価した (Fig. 20)。それぞれの pPRX にグルコースを添加すると、グルコース濃度の上昇に伴って濁度の減少が見られた。すなわち、pPRX は、崩壊したと考えられる。興味深いことに、カテコールの応答性は、CyD の種類によって異なった。 γ -CyD を用いた pPRX(γ -CyD/PBA-PEG) では、カテコールの添加で濁度の低下は見られなかった。

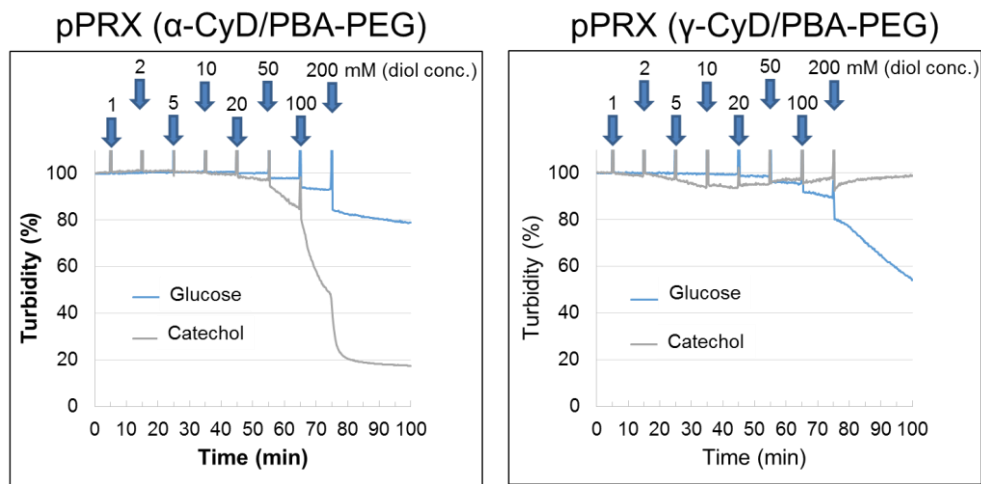


Fig. 20. Diol responses of the pPRX(α -CyD/PBA-PEG) and the pPRX(γ -CyD/PBA-PEG) (pH 7.4, 37°C).

グルコースの添加による濁度の減少メカニズムは、以下のように説明される (Fig. 21)³⁷。緩衝液に pPRX を添加すると、溶液中で pPRX は一部が溶解し、固体の pPRX と、溶解した CyD と PBA-PEG との平衡が生じる。ここにグルコースを添加すると、溶解している PBA-PEG とグルコースは結合する。これによって溶解した PBA-PEG が減少するため、それを補うように pPRX がさらに溶解し、濁度は減少したと考えられる。

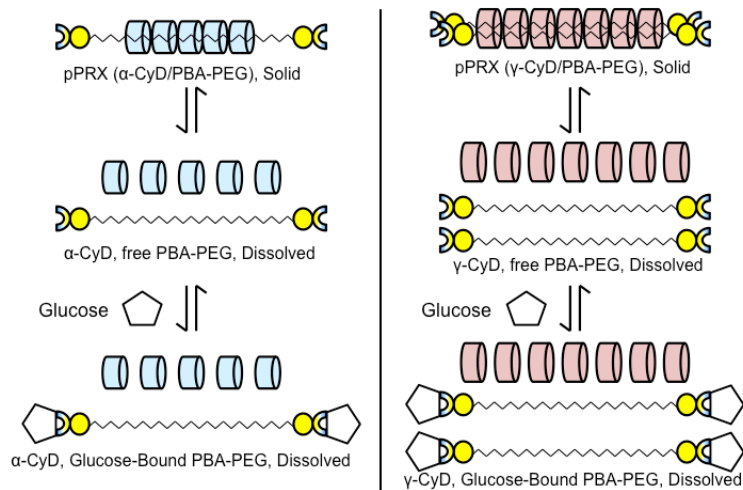


Fig. 21. Schematic representations of the glucose response mechanism of the pPRX(α -CyD/PBA-PEG) and the pPRX(γ -CyD/PBA-PEG).

ジオール化合物としてカテコールを用いた場合においても、緩衝液に加えることで、pPRXの一部が溶解し、溶解したPBA-PEGがカテコールと結合すると考えられる。しかし、 γ -CyDを用いた場合には、その空孔サイズが大きいためにこのカテコール-PBA-PEG結合体とpPRXを再形成する平衡が存在し、その結果として、pPRX(γ -CyD/PBA-PEG)の場合にはカテコールを添加しても濁度の減少が見られなかったと考えられる (Fig. 22)。

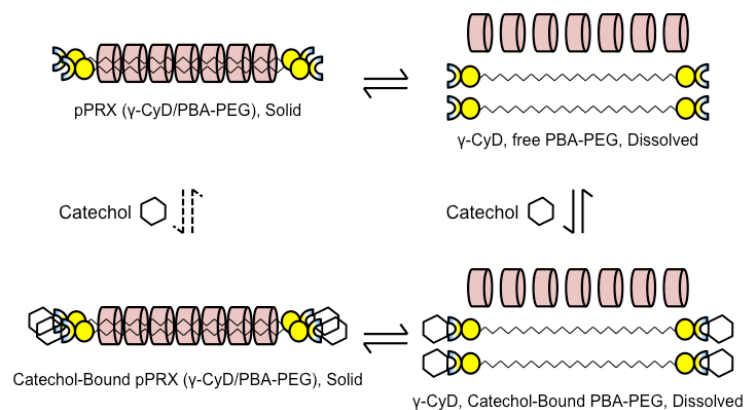


Fig. 22. Schematic representations of the catechol response mechanism of the pPRX(γ -CyD/PBA-PEG).

水中で PBA-PEG と CyD を共存させ、静置後、PE を添加してゲルの調製を試みた。しかし、溶液が白濁し、ゲルは得られなかった。これは、pPRX が固体として析出したことが原因と考えられる。

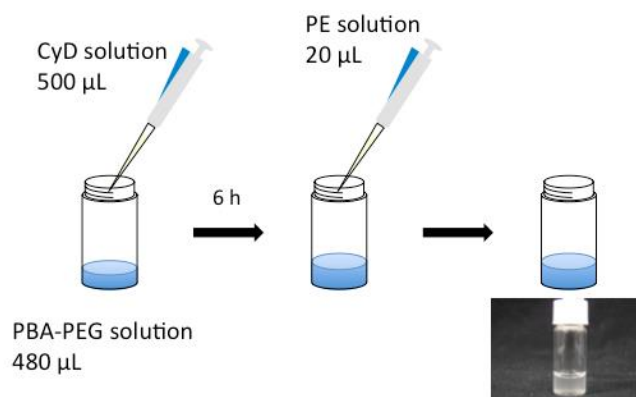


Fig. 23. Schematic representation of preparation of pPRX(CyD/PBA-PEG)-PEgel.

第3節 小括

第1章では、ゲルの架橋剤として PBA-PEG を利用する場合には、塩基性条件下でゲルの形成が可能であることを明らかにした。このゲルは、グルコースの添加で崩壊した。また、PBA-PEG と CyD を組み合わせて、1本鎖または2本鎖の pPRX が得られた。これらの pPRX は、グルコースの添加により溶解性が変化した。しかし、PBA-PEG と CyD からなるポリロタキサン構造を含むゲルの調製を試みたが、pPRX の溶解性制御が困難であったためゲルは得られなかった。

第2章 主鎖中に PBA を修飾したアクリルアミドゲルの調製とグルコース応答性

第2章では、ゲルの主鎖構造に PBA を導入したゲルの調製を試みた結果を記述する (Fig. 24)。ゲルの主鎖構造に PBA を導入するためにラジカル重合を利用してゲルを調製することとした。そこで、主鎖分子には重合可能で親水性のアクリルアミド (AAm) を用いた。CyD との組み合わせることを考え、架橋剤には PEG 誘導体を用いた。主鎖構造に PBA を導入することによってグルコースに反応して膨潤するゲルが調製できることが考えられる。また、他の官能基を同時に導入することによって収縮するゲルの調製も可能になると考えられる。さらに、これらのゲルを用いたマシンの試作も行った。

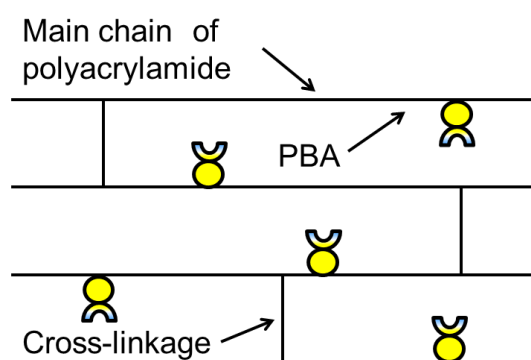
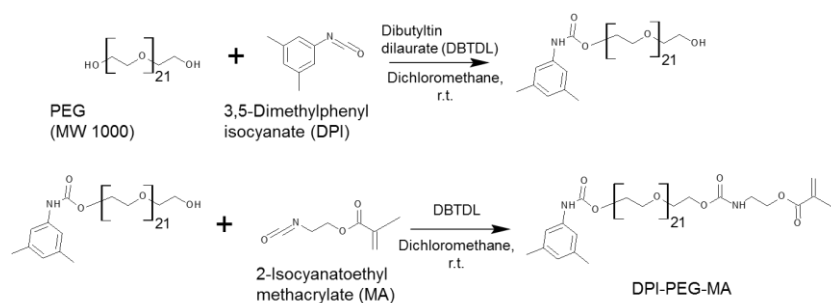


Fig. 24. Schematic representation of the gel having the PBA moiety on the main chain.

第1節 架橋剤の合成

片末端にかさ高い基、もう片末端にビニル基を有する架橋剤の合成を意図し、PEG (MW 1000) に 3,5-ジメチルフェニルイソシアナートを反応させ、次いで 2-メタクリロイルオキシエチルイソシアネートを反応させて、架橋剤材料を合成した³⁸⁾ (scheme 2)。かさ高い基は、CyD のストッパーとして、ビニル基は、重合反応に用いるために導入した。



Scheme 2. Preparation of PEG derivative as cross-linker.

しかし、FAB-MS の結果、片末端にかさ高い基、もう片末端にビニル基を持つ PEG (DPI-PEG1000-MA、赤丸印) と、両末端にビニル基を持つ PEG (MA-PEG1000-MA、青三角印) に由来するピークが観察された (Fig. 25)。すなわち、DPI-PEG1000-MA と MA-PEG1000-MA が混在するサンプルが得られた。そこで、この両末端にビニル基を有する成分を架橋剤として用いる検討を行った。

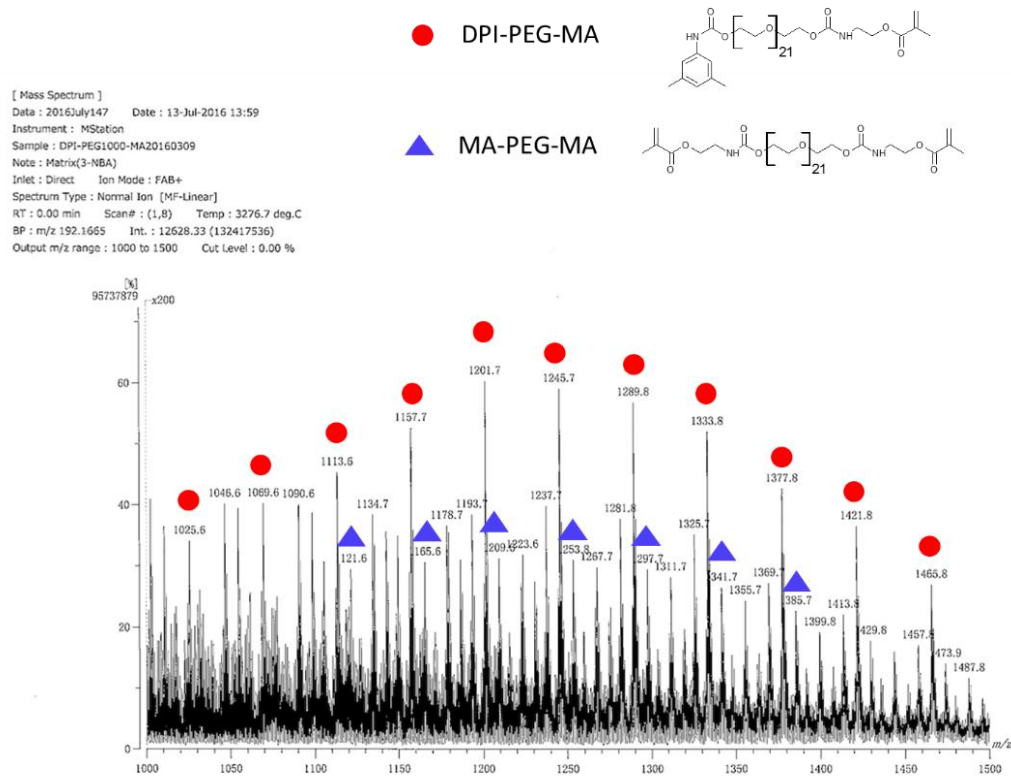


Fig. 25. Mass spectrum of PEG derivative as cross-linker.

第2節 ビニル化 PEG を用いたゲルの調製とそのグルコース応答性

第1項 グルコースに応答して膨潤するゲル

ゲルの主鎖分子には、重合可能で親水性の AAm を用いた。ラジカル重合により主鎖中に PBA を導入したゲルを調製できると考えた (Fig. 26)。

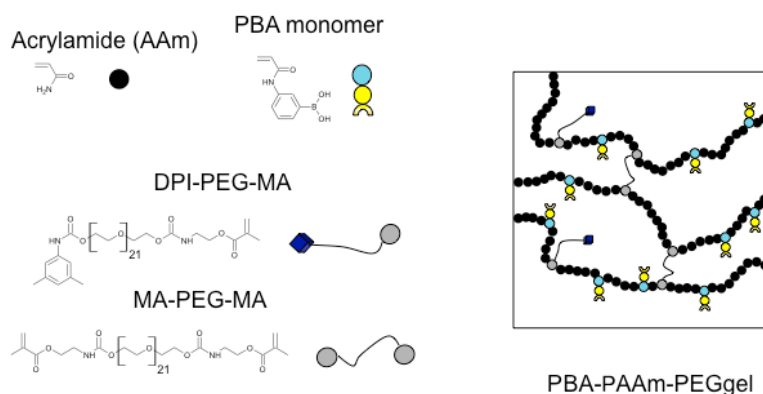
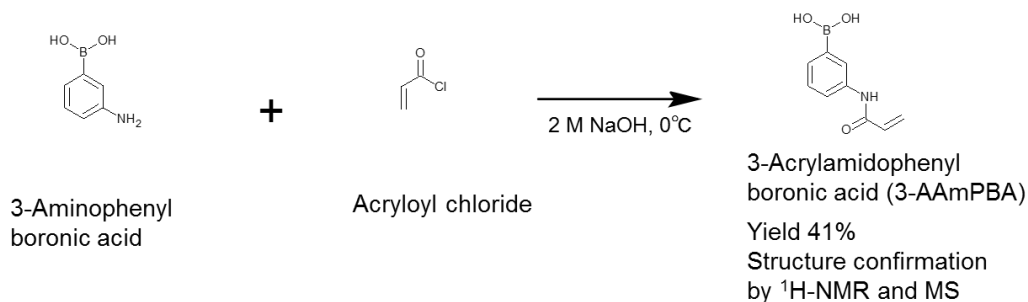
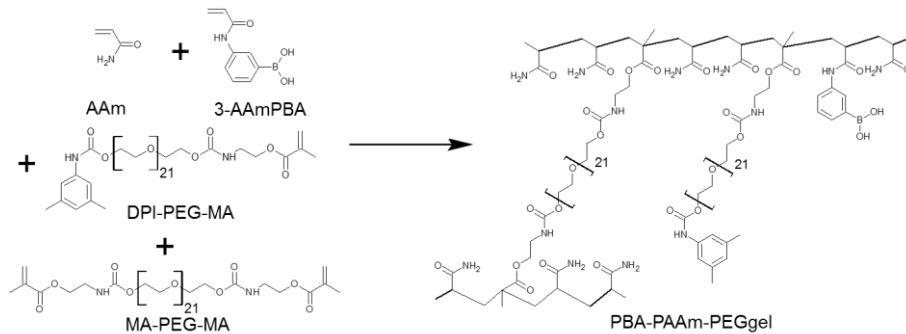


Fig. 26. Chemical structures of gel components and schematic representation of PBA-PAAm-PEGgel.

まず、PBA 部位を持つモノマー (3-AAmPBA) を 3-アミノフェニルボロン酸とアクリロイルクロリドを用いて合成した³⁹⁾ (Scheme 3)。3-AAmPBA、AAm、および合成した架橋剤 (DPI-PEG1000-MA と MA-PEG1000-MA) を用いてゲルを調製した (Scheme 4)。すなわち、NaOH 水溶液に架橋剤を加え攪拌後、各種モノマーを加えて、過硫酸アンモニウム (APS) で重合を開始し、PBA-PAAm-PEGgel を得た (Fig. 27)。PBA-PAAm-PEGgel を水に浸し、未反応のモノマーを取り除いた。



Scheme 3. Preparation of 3-AAmPBA.



Scheme 4. Preparation of PBA-PAAm-PEGgel.

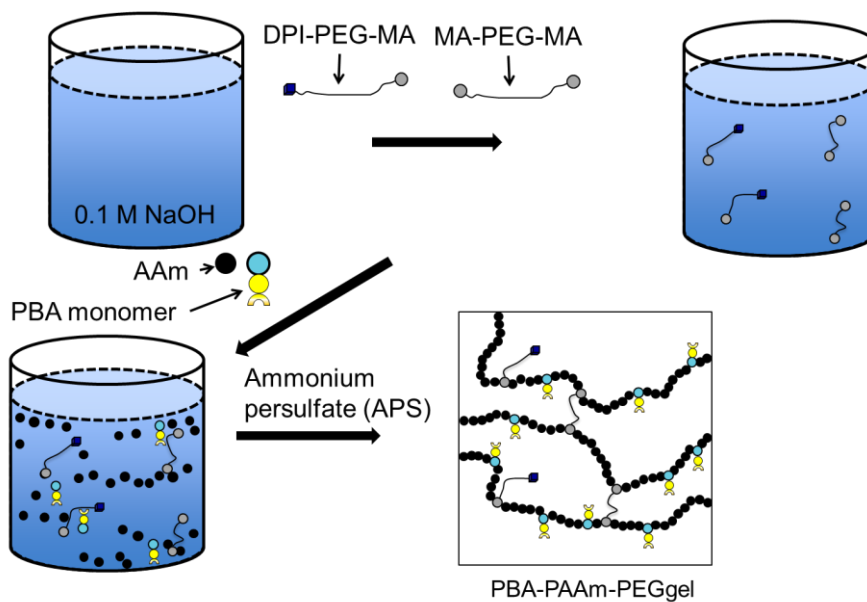


Fig. 27. Schematic representations of preparation of PBA-PAAm-PEGgel.

PBA-PAAm-PEGgel のグルコース応答性を評価するために、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸したゲルを、各種グルコース濃度 (5.0, 10, 20, 100 mM) の HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸し、ゲルの質量変化を測定した (Fig. 28)。PBA-PAAm-PEGgel は、グルコース濃度に依存した質量の増大が観察された。さらに、繰り返しの応答性を評価するために、グルコース非含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) とグルコース (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に繰り返し浸し、質量変化を測定した (Fig. 29)。グルコースの有無を繰り返すことで、質量の増減が観察され、ゲルが膨潤-収縮の繰り返し応答を示していることが明らかとなった。

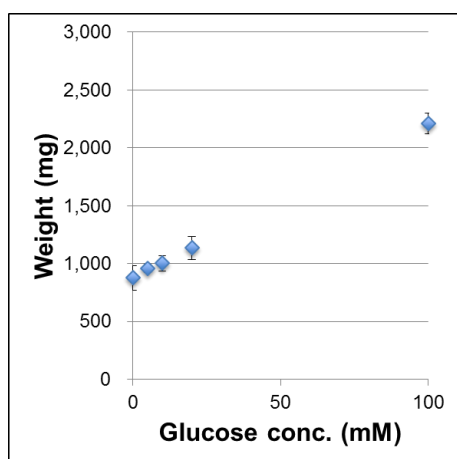


Fig. 28. Weights of PBA-PAAm-PEGgel in the presence and absence of glucose in HEPES (10 mM, pH 7.4).

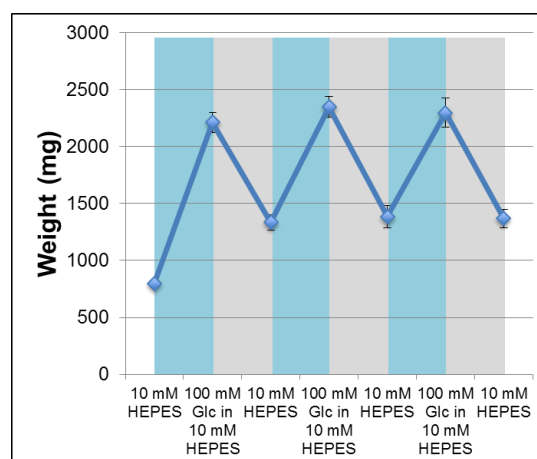


Fig. 29. Weight changes of PBA-PAAm-PEGgel in the presence and absence of glucose (100 mM) in HEPES (10 mM, pH 7.4).

続いて、PBA-PAAm-PEGgel の膨潤メカニズムを検討した。高分子鎖がもつ電荷を変化させるため、ゲルを浸す溶液の pH を変えることとした。pH を 7.4 から 9.0 に変えることで、ゲル質量は増加し、ゲルは膨潤した (Fig. 30)。今回用いた 3-AAmpBA の pK_a は、約 8.2 と報告されている⁴⁰⁾ ため、pH 7.4 条件下では、ほとんどの PBA は分子形であるが、pH 9.0 条件下では、PBA に水酸化物イオンが配位し、負電荷を帯びる^{41,42)} (Fig. 31)。この負電荷によって、対イオンが引き寄せられてゲル中の浸透圧が上昇し、水が流入することでゲルが膨潤したと考えられる。グルコースを添加した際は、PBA とグルコースが結合する。PBA がポリオール化合物と結合すると PBA 部位の pK_a が低下する。したがって、中性条件下でも PBA 部位に負電荷が生じ、同様に浸透圧が上昇し、膨潤したと考えられた (Fig. 31)。

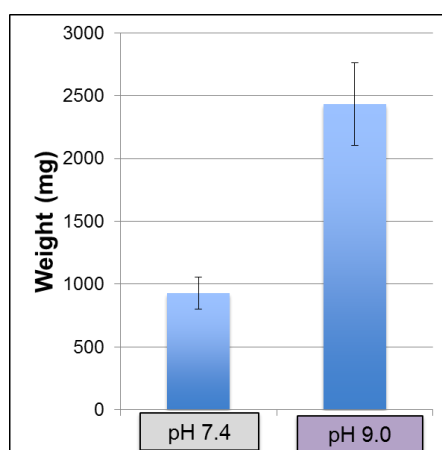


Fig. 30. Weights of PBA-PAAm-PEGgel in HEPES (10 mM, pH 7.4) and CHES (10 mM, pH 9.0).

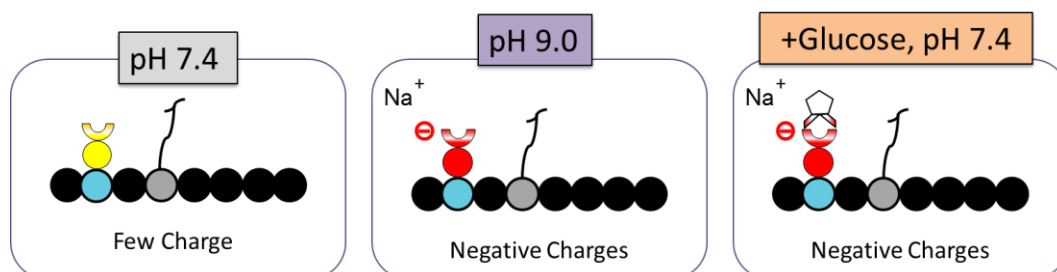


Fig. 31. States of electric charges of PBA-PAAm-PEGgel in the presence and absence of glucose in HEPES (10 mM, pH 7.4), and CHES (10 mM, pH 9.0).

第 2 項 グルコースに応答して収縮するゲル

ゲルの主鎖構造に 3 級アミノ基を持つ *N,N*-dimethylaminopropylacrylamide (DMAPAAm) を導入すると、糖が存在しない中性条件下で DMAPAAm 由来の 3 級アンモニウムが正電荷を帯びゲルが大きく膨潤すると期待できる。一方、糖が存在する中性条件下では、PBA 部位が負電荷を帯びること静電的引力が生じゲルが収縮すると期待できる。ゲルの主鎖構造には PBA の他に 3 級アミノ基を導入し、グルコースに反応して収縮するゲルの調製を行った (Fig. 32)。

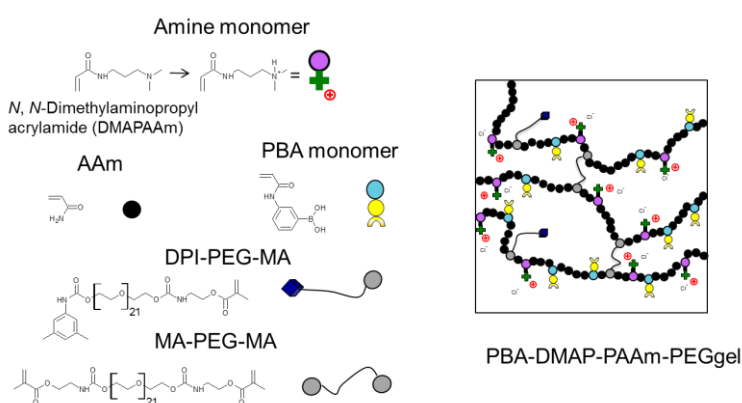
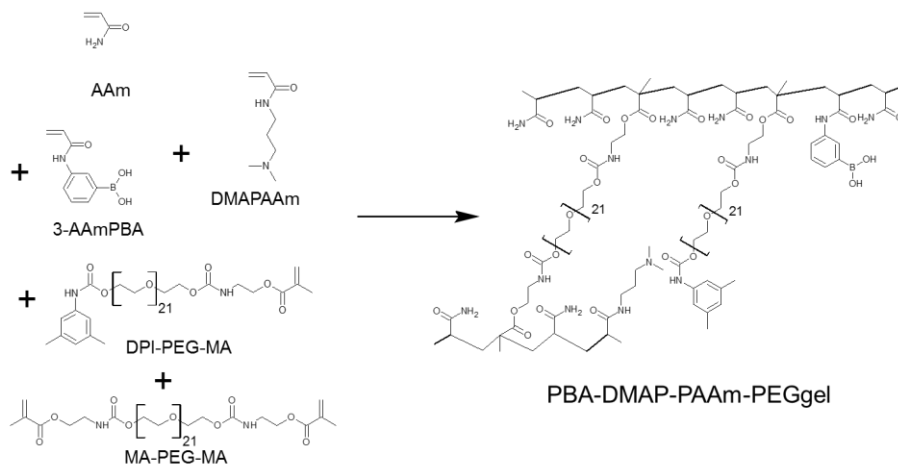


Fig. 32. Chemical structures of gel components and schematic representation of PBA-DMAP-PAAm-PEGgel.

3-AAmPBA、DMAPAAm、AAm、および合成した架橋剤 (DPI-PEG1000-MA と MA-PEG1000-MA) を用いてゲルを調製した (Scheme 5)。すなわち、NaOH 水溶液に架橋剤を加え攪拌後、各種モノマーを加えて、APS で重合を開始し、PBA-DMAP-PAAm-PEGgel を得た (Fig. 33)。得られた PBA-DMAP-PAAm-PEGgel を水に浸し、未反応のモノマーを取り除いた。



Scheme 5. Preparation of PBA-DMAP-PAAm-PEGgel.

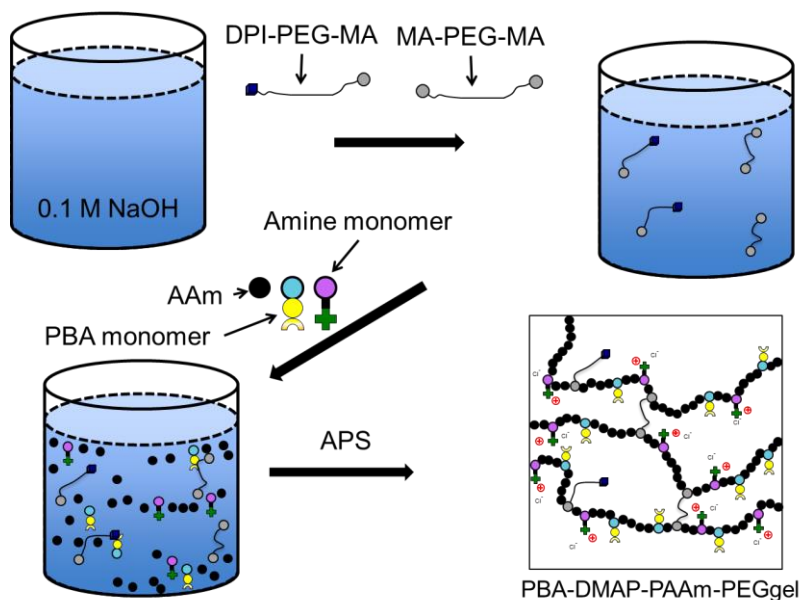


Fig. 33. Schematic representations of preparation of PBA-DMAP-PAAm-PEGgel.

PBA-DMAP-PAAm-PEGgel のグルコース応答性を評価するために、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸したゲルを、各種グルコース濃度 (5, 10, 20, 100 mM) の HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸し、ゲルの質量変化を測定した (Fig. 34)。PBA-DMAP-PAAm-PEGgel の質量は、グルコース濃度に依存して減少した。さらに、繰り返しの応答性を評価するために、グルコース (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4)、塩酸 (10 mM)、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) の順 (グルコース溶液-塩酸-HEPES 緩衝液) に繰り返し浸し、質量変化を測定した (Fig. 35)。グルコース溶液-塩酸-HEPES 緩衝液と外液を変更することでゲル質量の増減が繰り返し観察され、ゲルの収縮-膨潤が繰り返し生じることが明らかとなった。なお、本検討におけるグルコース暴露後の塩酸 (10 mM) への浸漬は、ゲルの洗浄を目的として行った。図としては示さなかったが、塩酸での洗浄過程を行わずにグルコース (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) と HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を繰り返した場合、HEPES 緩衝液中で初期の質量に完全に戻らなかった。これは、収縮した状態でグルコースがゲル中に取り込まれ、外液に拡散して溶出しないことが原因と考えられた。すなわち、塩酸などの酸性条件での洗浄により、グルコースの追い出しが可能になったと考えられる。

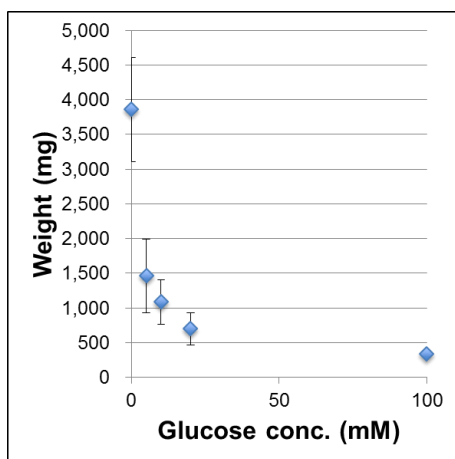


Fig. 34. Weights of PBA-DMAP-PAAm-PEG-gel in the presence and absence of glucose in HEPES (10 mM, pH 7.4).

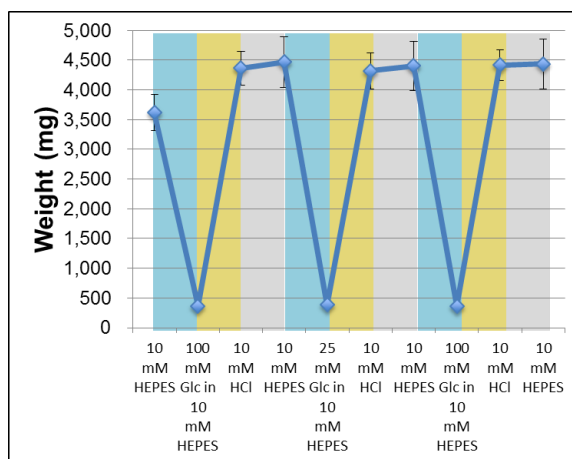


Fig. 35. Weight changes of PBA-DMAP-PAAm-PEG-gel in the presence and absence of glucose (100 mM) in HEPES (10 mM, pH 7.4) and HCl (10 mM).

PBA-DMAP-PAAm-PEGgel の収縮メカニズムを検討した。まず、浸す溶液の pH を変え、ゲル中の電荷を変化させた。pH を上昇させることで、ゲル質量は減少し、ゲルは収縮した (Fig. 36)。pH 7.4 では、3 級アンモニウム由来の正電荷により、クロライドイオンが流入し、浸透圧が上昇して膨潤していると考えられる (Fig. 37)。一方、pH 9.0 では、PBA が負電荷を帯び、両性電荷による高分子鎖間の静電的引力と、3 級アンモニウム由来の正電荷と PBA 由来の負電荷による電荷の打ち消しあいによるゲル内浸透圧の減少により、ゲルは収縮したと考えられる (Fig. 37)。グルコースを添加した際は、PBA とグルコースが結合する。PBA がポリオール化合物と結合すると PBA 部位の pK_a が低下する。したがって、中性条件下でも PBA 部位に負電荷が生じ、同様に静電的引力と電荷の打ち消しあいによるゲル内浸透圧が減少し、pH 9.0 の場合と同様に収縮したと考えられた (Fig. 37)。

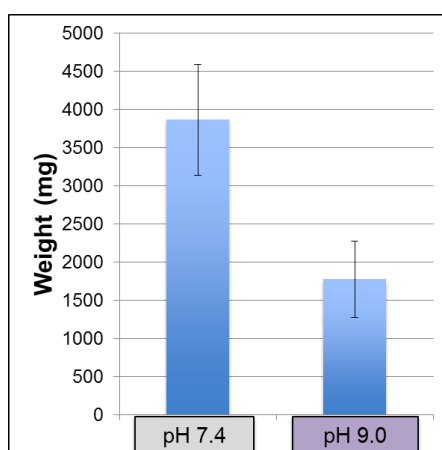


Fig. 36. Weights of PBA-DMAP-PAAm-PEGgel in HEPES (10 mM, pH 7.4) and CHES (10 mM, pH 9.0).

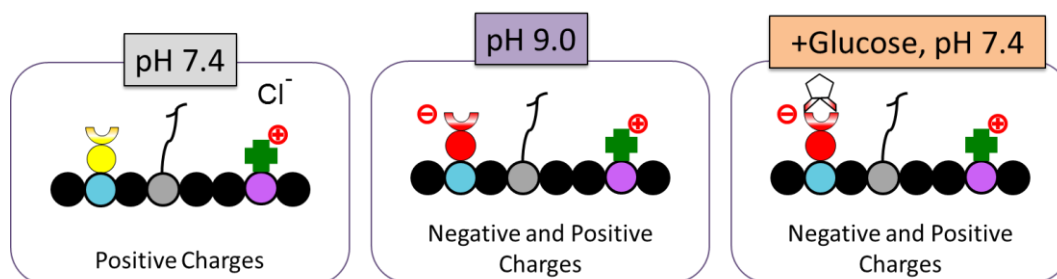


Fig. 37. States of electric charges of PBA-DMAP-PAAm-PEGgel in the presence and absence of glucose in HEPES (10 mM, pH 7.4), and CHES (10 mM, pH 9.0).

グルコースのフラノース形は、PBA との結合点を 2 点持ち、架橋を形成するが⁴³⁾、フルクトースは、PBA との結合点を 1 点しか持たないため、架橋を形成しない (Fig. 38)。この両者の違いが、ゲル収縮特性に影響するか検討した。もしグルコースが架橋を形成するのであれば、ゲル中の架橋密度が上昇し、ゲルの膨潤度は低くなり、より収縮すると考えられる。



Fig. 38. Chemical structures of glucose and fructose.

HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸した PBA-DMAP-PAAm-PEGgel を、各糖 (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸し、ゲルの質量を測定した。Table 4 に、それぞれの糖 (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸した時のゲル質量 (W_{sugar}) を、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸した時のゲル質量 (W_{HEPES}) で割った値 ($W_{\text{sugar}} / W_{\text{HEPES}}$)、およびそれぞれの糖に対して報告されている PBA の結合定数 (水, 25°C)⁴⁴⁾を示す。それぞれの糖に対する質量変化を比較してみると、フルクトースに比べ、グルコースの方が大きな質量変化を示した。つまり、グルコースの方が大きな応答性を示した。これは、結合定数から予測される結果とは異なるものとなった。グルコースでより大きな変化が得られたということは、2 つの PBA がグルコースに結合することで主鎖を架橋したため、より収縮したものと考えられることができる。

Table 4. Response of PBA-DMAP-PAAm-PEGgel for sugars (100 mM) and affinity between PBA and sugars

Sugar	Change in weight ratio of PBA-DMAP-PAAm-PEGgel	Binding constants of PBA (M^{-1})
Glucose	1/10	110
Fructose	1/2.0	4370

したがって、このゲルの収縮メカニズムは、両性イオンの静電的引力、電荷の打ち消しあいによるゲル内浸透圧の減少に加えて、グルコースによる可逆的な架橋が寄与していると考えられた (Fig. 39)。

Electrostatic Attraction + Cross-linking by Glucose

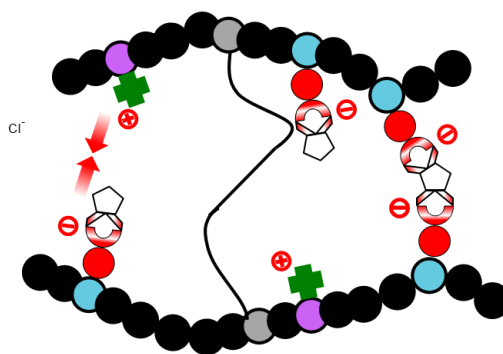


Fig. 39. Mechanism for shrinking of PBA-DMAP-PAAm-PEGgel.

第3項 グルコースメーターとゲルバルブの作製

前項までに、調製したゲルがグルコースに反応して膨潤または収縮することを示した。ゲルが定量的な応答を示せば、血糖センサーや人工膵臓のような応用が期待できる。この項では、調製したゲルを用いて、グルコース濃度に反応する2種類のマシン（グルコースメーターとゲルバルブ）の試作を試みた結果を記述する。

1つ目は、糖に反応して膨潤する PBA-PAAm-PEGgel と収縮する PBA-DMAP-PAAm-PEGgel の両方を用いたグルコースメーターの作製である (Fig. 40)。グルコースメーターは、血糖センサーへの応用が期待できる。グルコースメーターの作製においては、穴の開いたアクリル管にメーターの針を差し込み、その両側にゲルを詰め、アクリル棒で両側を閉じた。このグルコースメーターは、ゲルが膨潤または収縮することで、針が動く仕組みとなっている。グルコースに反応して針が動くかを見るために、このマシンを、グルコース (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に 24 時間浸し、その後、グルコース (200 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に 24 時間浸した。その結果、グルコース含有緩衝液に浸すことで、針が右に動くことを確認し、グルコース濃度を上昇することでさらに針が右に動くことを確認した (Fig. 41)。

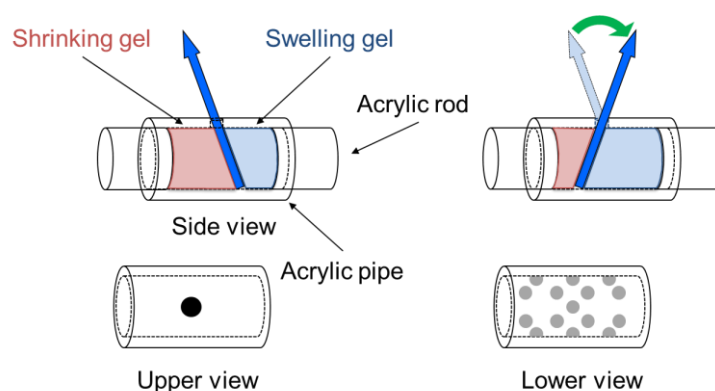


Fig. 40. Schematic representation of glucose meter using the PBA-PAAm-PEGgel and PBA-DMAP-PAAm-PEGgel.

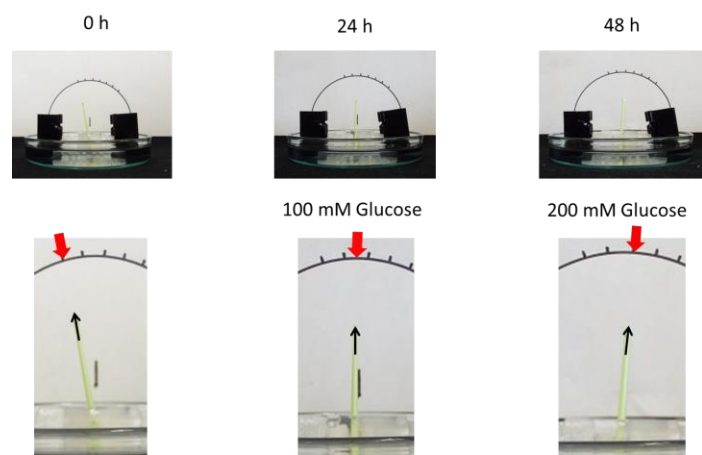


Fig. 41. Pictures of a glucose meter before soaking in a glucose solution and after soaking in a glucose (100 mM) in HEPES buffer (10 mM, pH 7.4) for 24 hours then soak in a glucose (200 mM) in a HEPES buffer (10 mM, pH 7.4) for another 24 hours.

2つ目は、糖に応答して収縮する PBA-DMAP-PAAm-PEGgel だけを用いたグルコース応答性ゲルバルブの作製である。グルコース濃度によって流量を変化させるバルブは、薬物の投与量をコントロールすることが期待できる。その作製においては、ガラス管にゲルを設置し、このゲルが落ちないように下に網を付けた (Fig. 42)。このバルブは、ゲルが収縮することで、ゲルにより塞がっていた流路が開く仕組みとなっている。グルコースに反応して流路が開くかを見るために、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) で漏れが生じないことを確認後、その溶液を取り除き、各グルコース濃度 (0, 10 or 100 mM) の HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) を加え、流路が開き漏れ出てくる溶液の滴下量を継時的に計測した (Fig. 43)。HEPES 緩衝液では、漏れなかったが、グルコース (100 mM) 含有緩衝液では、3 分後に流路が開いた。グルコース (10 mM) 含有緩衝液では、16 分後に流路が開いた。

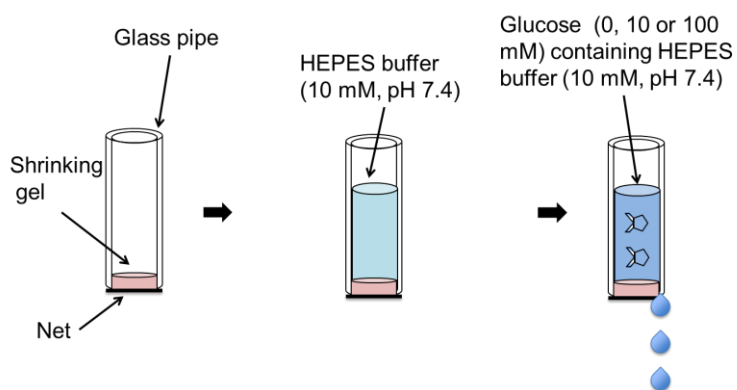


Fig. 42. Schematic representation of glucose responsive gel valve using the PBA-DMAP-PAAm-PEGgel.

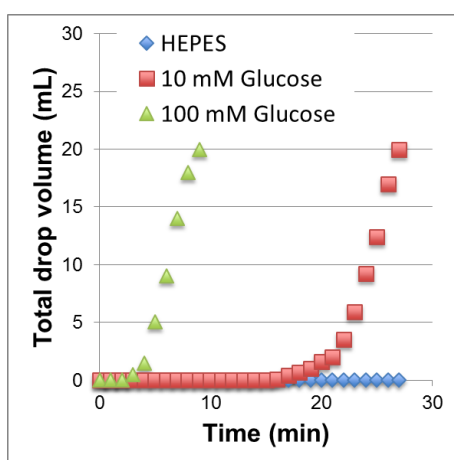


Fig. 43. Total drop volumes from the glucose responsive gel valve.

膨潤するゲルと収縮するゲルの両方あるいは収縮するゲルのみを用いて 2 種類のマシンを試作し、グルコースに応答してゲルが針を動かすことや流路を開くことに成功した。これらのマシン内で、ゲルは、これまでの検討と同様にグルコースに応答して膨潤または収縮し、マシンを機能させたと考えられる。しかし、どちらのマシンも応答速度は、速いとは言い難いものであった。血糖値の測定や人工膵臓など医療への応用面を考えると、速やかな応答が必要とされる。今回、ゲルの応答速度が遅かった原因として、ゲルが大きく、グルコースがゲル内に拡散するのに時間がかかったことが理由と考えられる。ゲルを調製する容器などを小さくし、より小さなゲルを調製することやマシン自体を小さくすることで、応答速度を向上させることが可能であると考えられる。ゲルバルブにおいては、グルコース濃度に応じて流速 (Fig. 43 の傾き) が変化することを期待したが、流路が開くまでの時間が変わるだけで、流速はあまり変わらなかった。流速をコントロールするためには、ゲルに導入する官能基の割合などを変化させ、糖応答性挙動といったゲル物性について調査していく必要があると考えられる。

第3節 架橋部位にロタキサン (RX) 構造を持つように設計したゲルの調製

高田らによって、シュードロタキサン構造を持つ架橋剤を用いて、ビニル重合によりスライドして架橋が伸び縮みするゲルが開発されている^{45, 46)}。本章第1節で示したように、合成した架橋剤材料は、片末端にかさ高い基、もう片末端にビニル基を有するものも含まれており、重合反応に先立って、 γ -CyDと共存させることでシュードロタキサン構造を有する架橋剤材料となり、重合により得られるゲルは、Figure 44のような構造になって、架橋が伸び縮みすることで化学架橋のゲルより大きな応答を示すと期待した。著者が試みたものは、この主鎖構造にPBAを導入したものである (Fig. 45)。

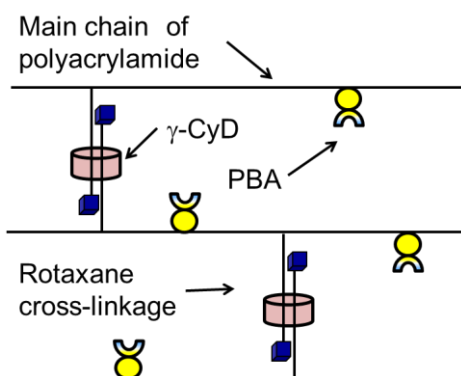


Fig. 44. Schematic representation of the gel having the rotaxane structures on the cross-linking point.

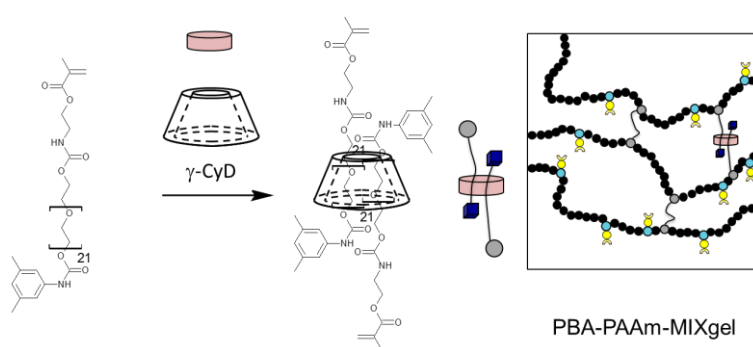


Fig. 45. Chemical structure of rotaxane cross-linker and schematic representation of PBA-PAAm-MIXgel.

その調製においてはまず、 γ -CyD 含有 NaOH 水溶液に本章第 1 節で得た架橋剤を加えて攪拌し、ロタキサン構造を持ち、かつ、架橋剤として働くロタキサン架橋剤の形成を期待した (Fig. 46)。そこに各種モノマーを加えて、APS で重合を開始し、PBA-PAAm-MIXgel を得た。得られた DMAP-PAAm-MIXgel を水に浸し、未反応のモノマーを取り除いた。

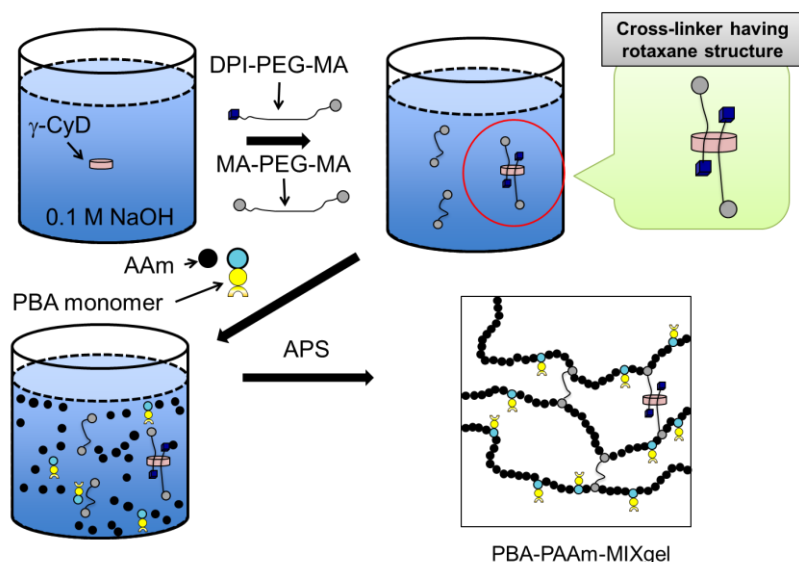


Fig. 46. Schematic representations of preparation of PBA-PAAm-MIXgel.

PBA-PAAm-MIXgel のグルコース応答性と繰り返しの応答性を評価するために、グルコース (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4)、塩酸 (10 mM)、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) の順 (グルコース溶液-塩酸-HEPES 緩衝液) に繰り返し浸し、質量変化を測定した (Fig. 47)。グルコース溶液-塩酸-HEPES 緩衝液と外液を変更することでゲル質量の増減が繰り返し観察された。 γ -CyD を組み合わせてロタキサン構造を導入したゲルでも、PBA-PAAm-PEGgel と同様にグルコースに対して膨潤応答を示すことが明らかとなった。応答性の向上は、PBA-PAAm-PEGgel と比較することで評価した。しかし、PBA-PAAm-MIXgel の応答性は、 γ -CyD を加えなかった PBA-PAAm-PEGgel と同等であった (Fig. 47)。これは、一連の調製において、架橋剤材料中の両末端にビニル基を有する成分を分離除去していないため、本章第 2 節で調製したゲル中に存在している化学架橋が同程度に存在するため、ロタキサン架橋の効果が現れなかったと考えられる (Fig. 48)。ロタキサン架橋の効果を得るためには、架橋剤材料の精製、もしくは、架橋剤合成の方法自体の変更など、更なる検討が必要である。

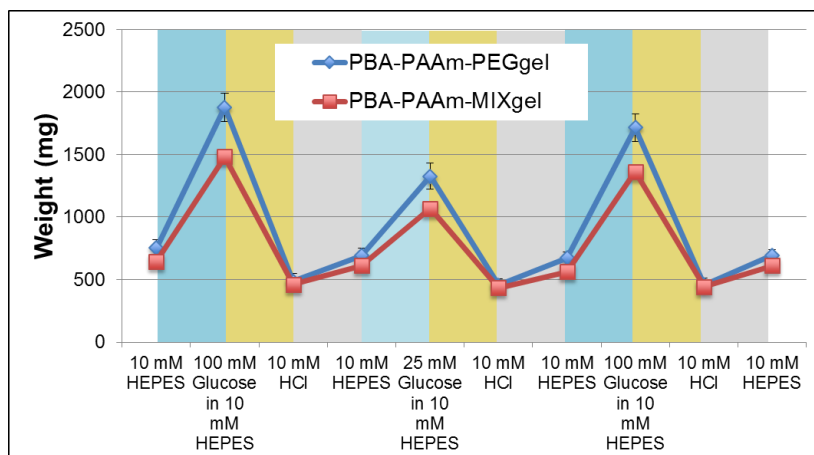


Fig. 47. Weight changes of PBA-PAAm-MIXgel and PBA-PAAm-PEG-gel in the presence and absence of glucose (25 or 100 mM) in HEPES (10 mM, pH 7.4) and HCl (10 mM).

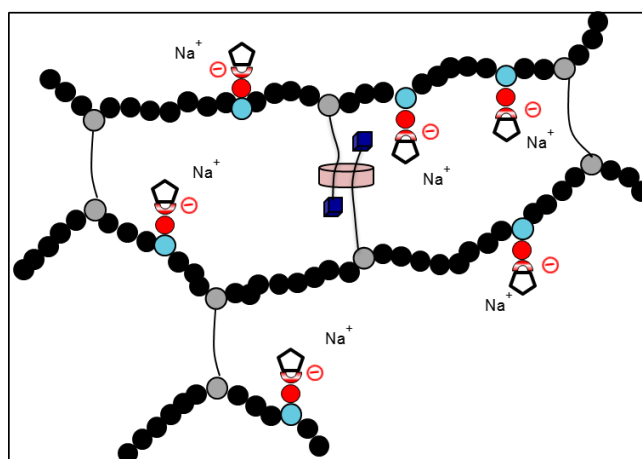


Fig. 48. Schematic representation of structure of the PBA-PAAm-MIXgel.

第4節 小括

第2章では、ゲルを合成する際のモノマーの構成を変えることで、グルコースに応答して膨潤または収縮するゲルを調製した。PBA-PAAm-PEGgelのグルコースによる膨潤メカニズムは、グルコースとPBAが結合することによって生じた高分子鎖のイオン化によるゲル内の浸透圧上昇が寄与していると考えられる。PBA-DMAP-PAAm-PEGgelのグルコースによる収縮メカニズムは、3級アンモニウム由来の正電荷とグルコースとPBAとの結合により生じた負電荷の静電的引力、電荷の打ち消しあいによるゲル内浸透圧の減少、およびグルコースによる架橋が寄与していると考えられる。得られた収縮するゲル、もしくはそれと膨潤するゲルを組み合わせることで有機成分のみからなる2種のマシンの試作を行った。またさらに、応答性の向上を目指して架橋部にロタキサン構造を導入したゲルの調製を試みたが、得られたゲルの膨潤特性は、 γ -CyDを加えなかったものと同様であった。これは、化学架橋が主に影響してしまったと考えられ、応答性の向上を目指すにはロタキサン構造の架橋部のみになるような分子設計が必要である。

第 3 章 架橋点に PBA を修飾したスライドラングゲル (PBA-SRgel) の調製とグルコース応答性

第 3 章では、架橋点に PBA を導入し、その架橋部がスライドするゲルの調製を試みた結果を記述する (Fig. 49)。伊藤らによって、PRX の CyD 同士を低分子架橋剤で架橋し、架橋点の主鎖をスライドする SRgel が開発されている⁴⁷⁾。架橋点のスライドすることによって、大きく膨潤することが期待できる。著者は PBA を修飾した低分子架橋剤を用いて、架橋点に PBA を導入したゲル (PBA-SRgel) の調製を試みた。

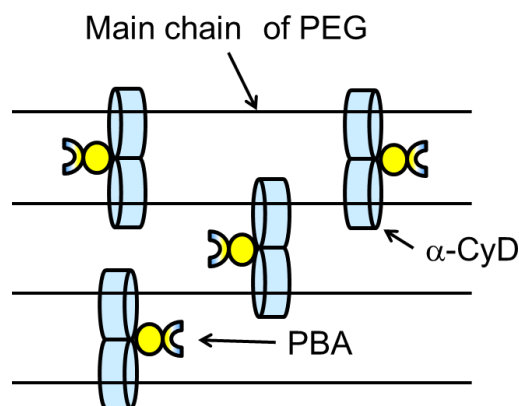


Fig. 49. Schematic representation of the gel having the PBA moiety on the cross-linking point.

第1節 刺激に応答して膨潤するゲルの調製とそのグルコース応答性

Figure 50 には、PBA-SRgel の化学構造と模式図を示す。

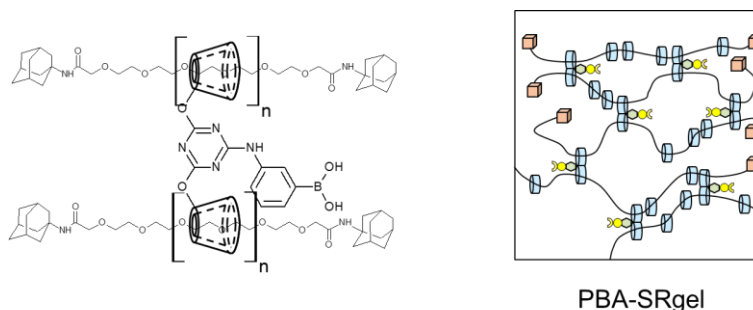
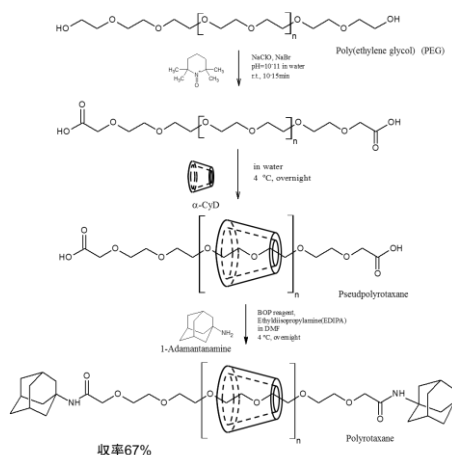


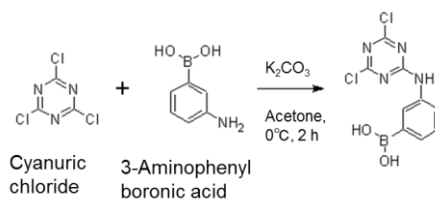
Fig. 50. Chemical structure and schematic representation of PBA-SRgel.

まず、PBA-SRgelの主鎖分子となるPRXの調製を行った⁴⁸⁾ (Scheme 6)。水中でPEG (MW 20,000)の末端を、2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl free radical (TEMPO)を用いて酸化し、PEG-carboxylic acid (PEG-COOH)を合成した。このPEG-COOHとCyDを混合し、pPRXをとり、1-アダマンタナミンで末端を封鎖し、PRXを得た。¹H-NMRを用いて、被覆率を求めた。ここでいう被覆率とは、PEG鎖上をCyDが覆っている程度を表す尺度である。¹H-NMRの結果、被覆率は、37%であった。すなわち、残りの約60%の範囲をCyDはスライドすることができると考えられる。

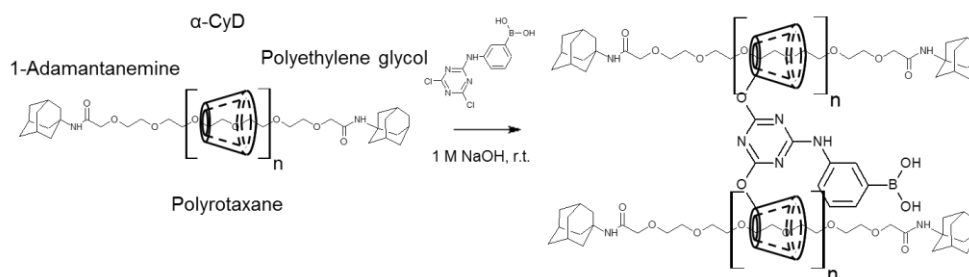


Scheme 6. Preparation of polyrotaxane.

ゲルの調製において、3点反応点を持つ塩化シアヌルの1点に3-アミノフェニルボロン酸を修飾し⁴⁹⁾ (Scheme 7)、残りの2点にPRXのCyDを結合することでCyD同士を架橋し、PBA-SRgelを得た (Scheme 8)。PBA-SRgelを水/エタノール (1:1, v/v) に浸し、未反応物質を取り除いた。



Scheme 7. Preparation of PBA-modified cyanuric chloride.



Scheme 8. Preparation of PBA-SRgel.

PBA-SRgel の糖応答性を評価するために、緩衝液 (*N*-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid (CHES) or HEPES, 10 mM, pH 9.0 or pH 7.4) に浸したゲルを、糖 (グルコースあるいはフルクトース, 100 mM) 含有緩衝液 (CHES or HEPES, 10 mM, pH 9.0 or pH 7.4) に浸し、ゲルの質量変化を測定した (Fig. 51)。PBA-SRgel に糖を添加することで、ゲル質量の増加が観察され、膨潤した。しかし、その膨潤応答の程度は、前章で示した PBA-PAAm-PEGgel より小さかった。

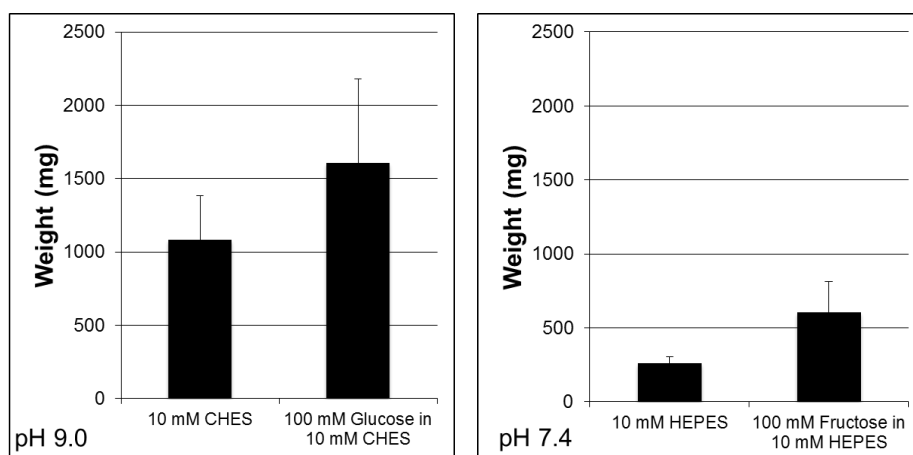


Fig. 51. Weights of PBA-SRgel in the presence and absence of glucose (100 mM) and fructose (100 mM) in CHES (10 mM, pH 9.0) and HEPES (10 mM, pH 7.4).

第2節 PBA-SRgel の機械的性質の評価

PBA-SRgel は膨潤応答性で劣っていたが、架橋点がスライドする SRgel 構造特有の特性を PBA-SRgel が示すかを確認するため、PBA-SRgel の機械的性質の評価を行った。すなわち、レオメーターを用いて、PBA-SRgel の同一ひずみを繰り返し加えた場合の応力変化と等速度でひずみを増加させた場合の構造破壊を測定した。

HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸した PBA-SRgel に同一ひずみ (1.0 mm) を繰り返し加えた場合 (Fig. 52)、PBA-SRgel は、繰り返しのひずみに対して 0.17 N の繰り返しの応力応答を示した (Fig. 52a, ばね定数=0.17 N/mm)。このことから、完全な弾性体としての特徴を持つことがわかった。フルクトースを添加して膨潤した状態でも同様の応力応答を示したが (Fig. 52b)、そのばね定数は 0.032 N/mm であり、ばね定数の減少が認められた。しかし、フルクトースを添加した場合でも、弾性体として振る舞うことが確認された。

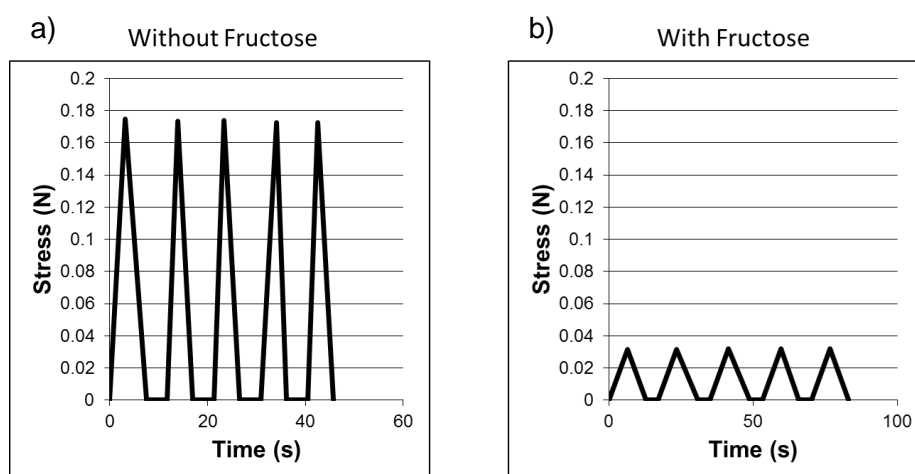


Fig. 52. Stresses of PBA-SRgel in the presence and absence of fructose (100 mM) in HEPES (10 mM, pH 7.4).

フルクトース (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸した PBA-SRgel に等速度でひずみを増加させた場合 (Fig. 53)、PBA-SRgel は、前章で示した PBA-PAAm-PEGgel と比較して応力が緩やかに増加した。さらに、PBA-SRgel は、応力が上昇した後、一度応力が下がり、再び応力が上昇し、また減少するという 2 段階の応力変化を示した。急激な応力の減少は、ゲルの内部構造変化を示唆するものと考えられる。1 段階目は、リングがスライドすることによる緩和、2 段階目は、構造破壊によるものと考えられる。

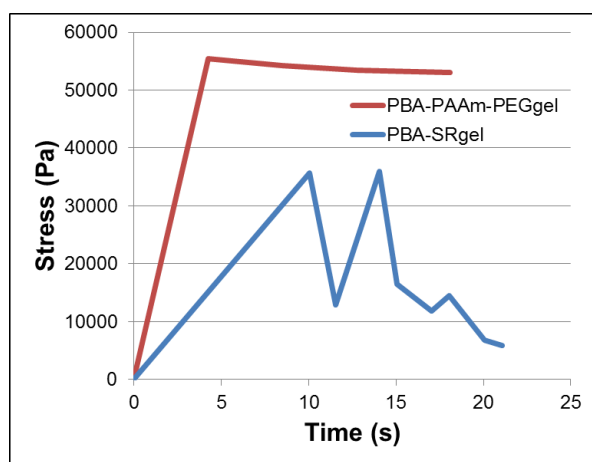


Fig. 53. Stresses of PBA-SRgel and PBA-PAAm-PEGgel in fructose (100 mM) in HEPES (10 mM, pH 7.4).

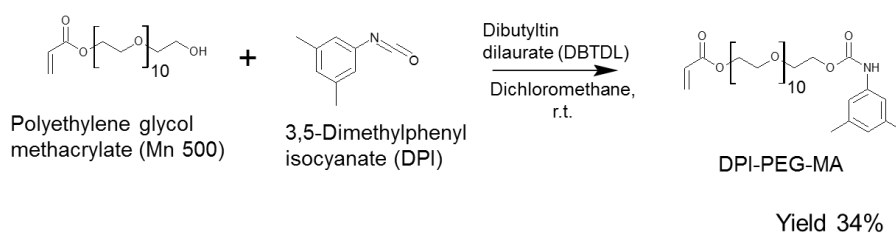
第3節 小括

第3章では、架橋点に PBA を導入した SRgel の調製を行い、グルコースに
応答して膨潤する SRgel が得られることを示した。このような刺激に応答して反
応する SRgel はこれまでに報告されていない。しかし、その応答性は小さかつ
た。導入する PBA 誘導体を変える等の改善が必要と考えられる。得られた PBA-
SRgel は、糖の有無にかかわらず弾性体として働いた。フルクトースの存在下で
ばね定数が 1/5 以下に減少した。PBA-SRgel は、その構造破壊において、結合点
のスライドに関係すると思われる特異な挙動を示した。SRgel のこの特徴的な弾
性特性は、大きなひずみがかかった時にゲルが崩れるのを防ぐ可能性があるた
め、有機成分からなるマシンを作製する際、有効であると考えられる。

第 4 章 架橋部分がスライドして伸縮するゲルの調製とグルコース応答性

第 1 節 架橋部分にヘテロ修飾 PEG と γ -CyD からなるロタキサン (RX) 構造を有するゲルの調製とグルコース応答性

第 2 章第 3 節では、ロタキサン架橋を持つゲルを目指して、DPI-PEG1000-MA と MA-PEG1000-MA が混在する架橋剤と γ -CyD を組み合わせてゲルの調製を行った。しかし、そのゲルの糖応答性は、 γ -CyD を加えなかったゲルと比較して変化しなかったことを示した。これは、合成した架橋剤材料を精製しないで用いたため、含有する両末端にビニル基を有する PEG に起因する化学架橋が主に効いてしまったためと考えられる。そこで、本節では、PEG 誘導体の分子設計を変え、ゲル中にスライドする架橋のみが生じるように設計した結果を記述する。具体的には、片末端にビニル基をもつ PEG を出発物質として、もう片末端にかさ高い基を修飾することで、片末端にビニル基、もう片末端にかさ高い基をもつ PEG のみを合成した (Scheme 9)。元々片末端にビニル基が修飾されている PEG を用いることで、化学架橋を形成する両末端にビニル基をもつ PEG が混在するのを防げると考えた。



Scheme. 9. Preparation of DPI-PEG-MA.

ゲルの調製方法を以下に示す。 γ -CyD 含有 NaOH 水溶液に DPI-PEG500-MA を加え攪拌し、ロタキサン構造を持ち、かつ、架橋剤として働くロタキサン架橋剤を調製した (Fig. 54)。そこに各種モノマーを加えて、過硫酸アンモニウム (APS) で重合を開始し、PBA-PAAm-RXgel を得た。PBA-PAAm-RXgel を水に浸し、未反応のモノマーを取り除いた。

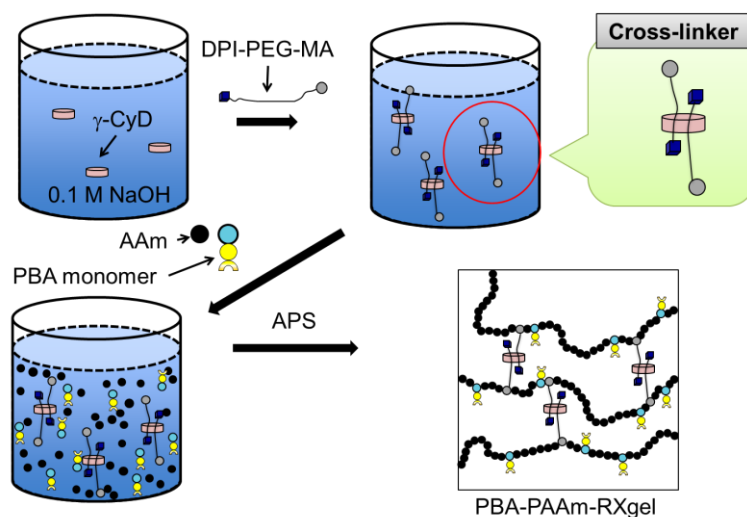


Fig. 54. Schematic representations of preparation of PBA-PAAm-RXgel.

PBA-PAAm-RXgel のグルコース応答性を評価するために、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸したゲルを、各種グルコース濃度 (5, 10, 20, 100 mM) の HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸し、ゲルの質量変化を測定した (Fig. 55)。PBA-PAAm-RXgel は、グルコース濃度に依存した質量の増加が観察された。PBA-PAAm-PEGgel と比較して、低いグルコース濃度 (10, 20 mM) で膨潤の程度が大きかった (Fig. 56)。架橋がロタキサン構造のみからなるように設計することで低いグルコース濃度における膨潤性が改善された。さらに、繰り返しの応答性を評価するために、グルコース非含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) とグルコース (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に繰り返し浸し、質量変化を測定した (Fig. 57)。グルコースの有無を繰り返すことで、質量の増減が観察された。PBA-PAAm-RXgel も膨潤-収縮の繰り返し応答を示すことが明らかとなった。しかし、膨潤の程度は、初回が最も高く、グルコースを含まない緩衝液に浸しても初期質量には戻らなかった。

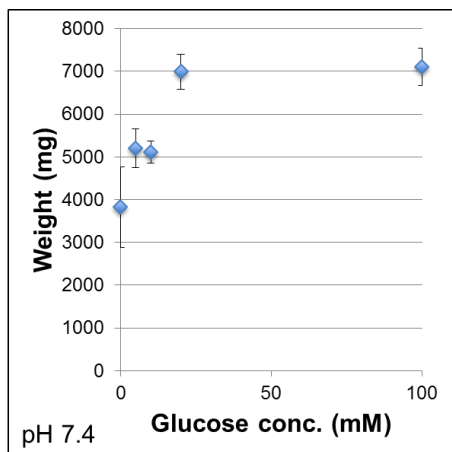


Fig. 55. Weights of PBA-PAAm-RXgel in the presence and absence of glucose in HEPES (10 mM, pH 7.4).

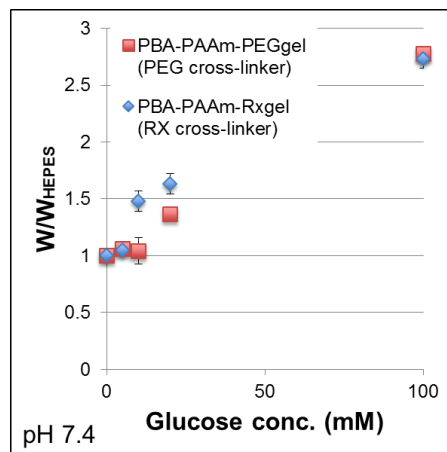


Fig. 56. Weights of PBA-PAAm-RXgel and PBA-PAAm-PEGgel in the presence and absence of glucose in HEPES (10 mM, pH 7.4).

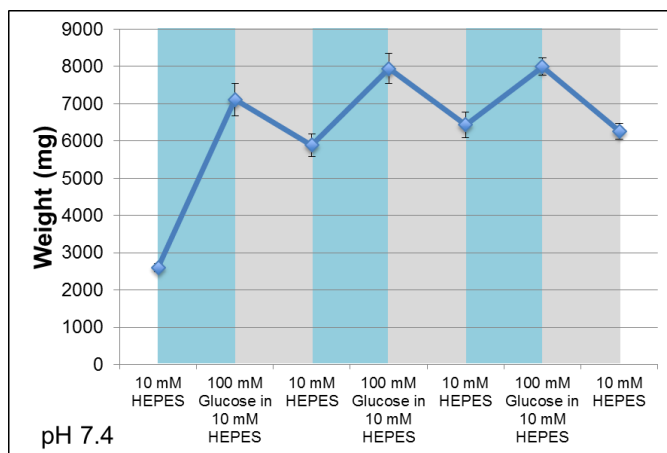


Fig. 57. Weight changes of PBA-PAAm-RXgel in the presence and absence of glucose (100 mM) in HEPES (10 mM, pH 7.4).

同様に収縮するゲルも調製した (Fig. 58)。 γ -CyD 含有 NaOH 水溶液に DPI-PEG500-MA を加え攪拌し、ロタキサン構造を持ち、かつ、架橋剤として働くロタキサン架橋剤を調製した。そこに各種モノマーを加えて、APS で重合を開始し、PBA-DMAP-PAAm-RXgel を得た。PBA-DMAP-PAAm-PEGgel を水に浸し、未反応のモノマーを取り除いた。

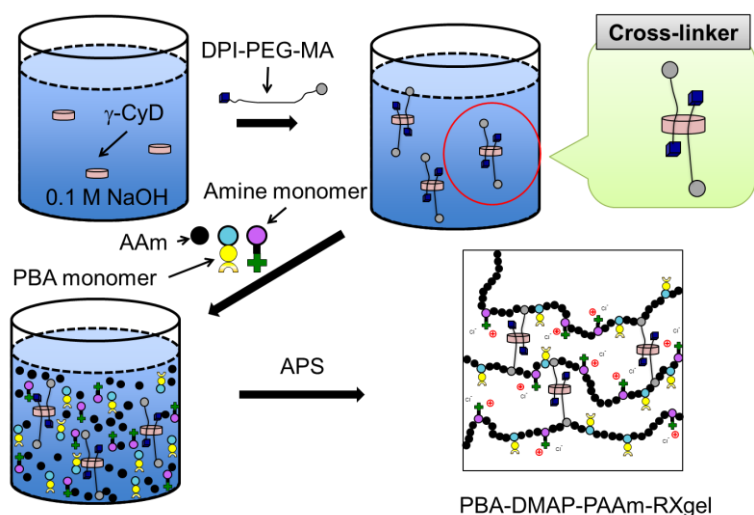


Fig. 58. Schematic representations of preparation of PBA-DMAP-PAAm-RXgel.

PBA-DMAP-PAAm-RXgel のグルコース応答性を評価するために、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸したゲルを、各種グルコース濃度 (5, 10, 20, 100 mM) の HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸し、ゲルの質量変化を測定した (Fig. 59)。PBA-DMAP-PAAm-RXgel は、グルコース濃度に依存した質量の減少が観察された。PBA-PAAm-PEGgel と比較して、PBA-DMAP-PAAm-RXgel は、低いグルコース濃度 (5, 10 mM) で収縮の程度が大きかった (Fig. 60)。架橋がロタキサン構造のみからなるように設計することで低いグルコース濃度における収縮性が改善された。さらに、繰り返しの応答性を評価するために、グルコース非含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) とグルコース (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に繰り返し浸し、質量変化を測定した (Fig. 61)。グルコースの有無を繰り返すことで、質量の増減が観察された。PBA-DMAP-PAAm-RXgel も収縮-膨潤の繰り返しの応答を示すことが明らかとなった。しかし、収縮の程度は、初回が最も高く、グルコースを含まない緩衝液に浸しても初期質量に完全には戻らなかった。

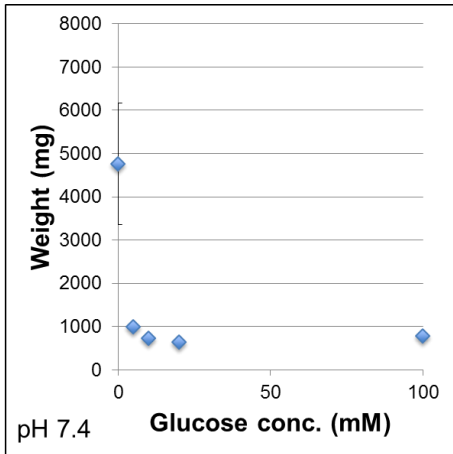


Fig. 59. Weights of PBA-DMAP-PAAm-RXgel in the presence and absence of glucose in HEPES (10 mM, pH 7.4).

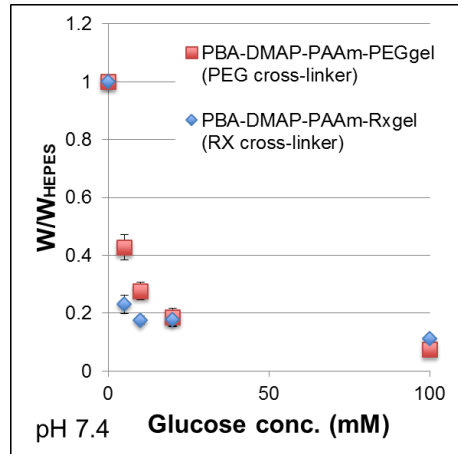


Fig. 60. Weights of PBA-DMAP-PAAm-RXgel and PBA-DMAP-PAAm-PEGgel in the presence and absence of glucose in HEPES (10 mM, pH 7.4).

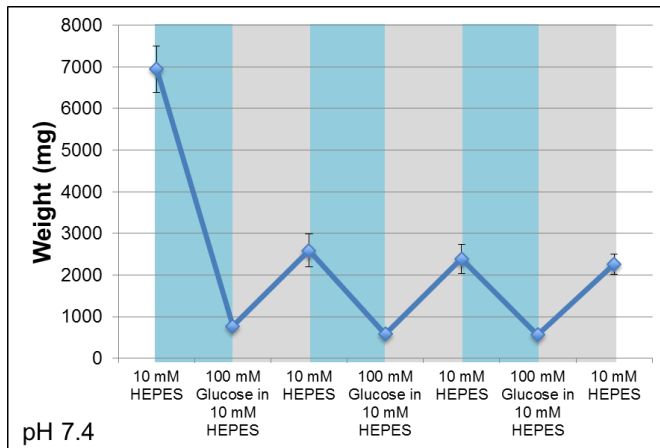


Fig. 61. Weight changes of PBA-DMAP-PAAm-RXgel in the presence and absence of glucose (100 mM) in HEPES (10 mM, pH 7.4).

第 2 節 架橋部分にポリロタキサン(PRX) 構造を有するゲルの調製とグルコース応答性

架橋点にロタキサン構造を持つゲルは、繰り返しの応答は示したが、グルコースを含まない溶液に浸しても初期の質量には戻らなかった。これは、一度架橋構造が伸びきってしまうと、グルコースを取り除いても CyD が元の位置に戻らないことが原因として考えられ、CyD が元の位置に戻らない状態で膨潤-収縮を繰り返したと考えられる。一方、第 3 章に示した SRgel は、伸びたときに環状分子が不均一になって、このひずみを戻そうという力が働く。したがって、この SRgel の構造を架橋点に用いることで、このひずみを戻す力が加わり、スライドする架橋剤を用いたゲルに置いても繰り返し応答性が向上するのではないかと考えた (Fig. 62)。

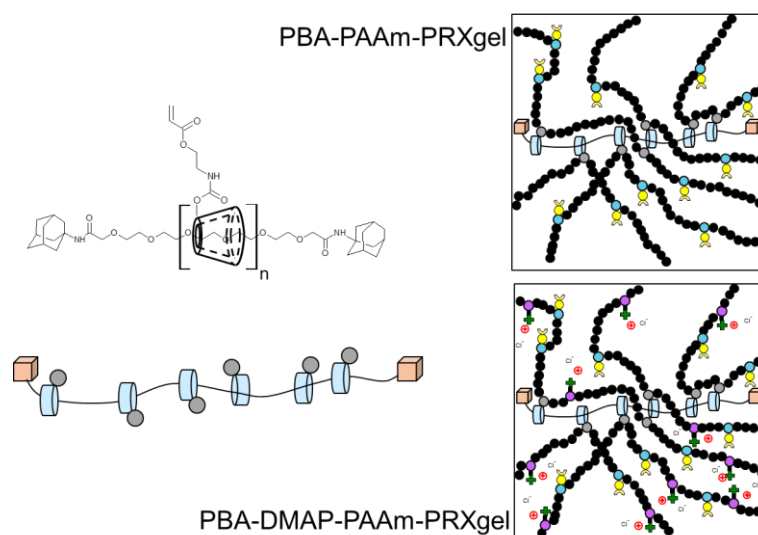
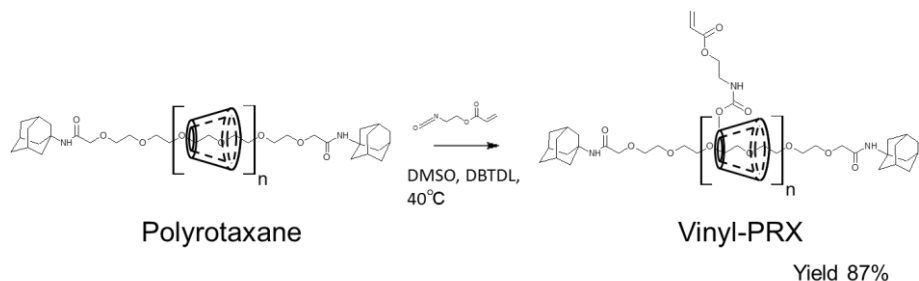


Fig. 62. Chemical structure of Vinyl-polyrotaxane and schematic representations of PBA-PAAm-PRXgel and PBA-DMAP-PAAm-PRXgel.

そこで、ポリロタキサン構造を有する架橋剤の調製を行った^{50,51)} (Scheme 10)。PRX にアクリル酸 2-イソシアナトエチルを反応させ、ビニル基をもつ PRX (Vinyl-PRX)を合成した。



Scheme 10. Preparation of Vinyl-polyrotaxane.

PBA-PAAm-PRXgel の調製方法を以下に示す。DMSO に各種モノマーとビニル基をもつ PRX、開始剤であるアゾイソブチロニトリル (AIBN) を溶かし、60°C で 24 時間ゲル化させた (Fig. 63)。PBA-PAAm-PRXgel を DMSO 次いで水に浸し、未反応のモノマーを取り除いた。

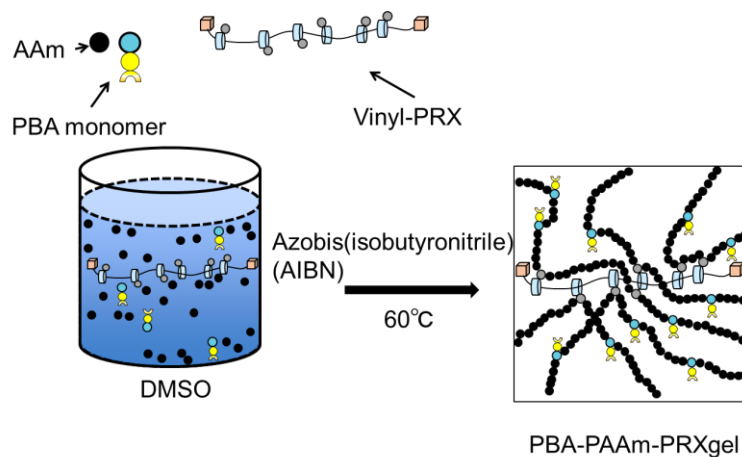


Fig. 63. Schematic representations of preparation of PBA-PAAm-PRXgel.

PBA-PAAm-RXgel のグルコース応答性を評価するために、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸したゲルを、各種グルコース濃度 (1, 5, 10, 100 mM) の HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸し、ゲルの質量変化を測定した (Fig. 64)。PBA-PAAm-PRXgel は、グルコース濃度に依存した質量の増加が観察された。PBA-PAAm-PEGgel・PBA-PAAm-RXgel と比較して、PBA-PAAm-PRXgel は、低濃度から高濃度 (1~100 mM) の広い範囲でグルコースによる濃度依存的な膨潤性を示した。架橋部がポリロタキサン構造からなるゲルは、広い濃度範囲でグルコースによる膨潤が改善され、大きな応答を示した (Fig. 65)。さらに、繰り返しの応答性を評価するために、グルコース非含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) とグルコース (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に繰り返し浸し、質量変化を測定した (Fig. 66)。グルコースの有無を繰り返すことで、質量の増減が観察され、ゲルが膨潤-収縮の繰り返し応答を示すことが明らかとなった。また、PBA-PAAm-PRXgel は、グルコースを含まない緩衝液に浸すことで初期質量に戻ることが示された。PBA-PAAm-RXgel と繰り返しの応答性を比較すると、PBA-PAAm-RXgel では膨潤度 (W / W_{HEPES}) が $1.0 \rightarrow 2.7 \rightarrow 2.3$ と変化した。PBA-PAAm-PRXgel は W / W_{HEPES} が $1.0 \rightarrow 7.2 \rightarrow 1.1$ と変化した (Fig. 67)。すなわち、PBA-PAAm-PRXgel は、PBA-PAAm-RXgel と比較し、より優れた繰り返し応答を示した。

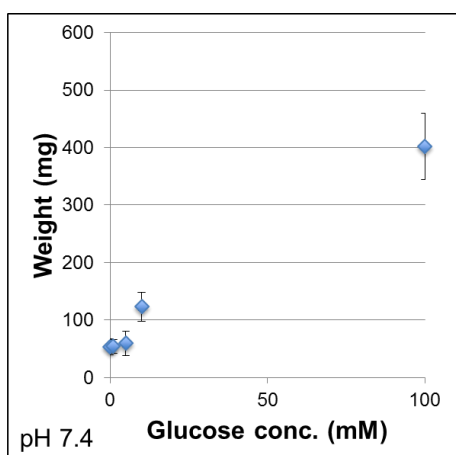


Fig. 64. Weights of PBA-PAAm-PRXgel in the presence and absence of glucose in HEPES (10 mM, pH 7.4).

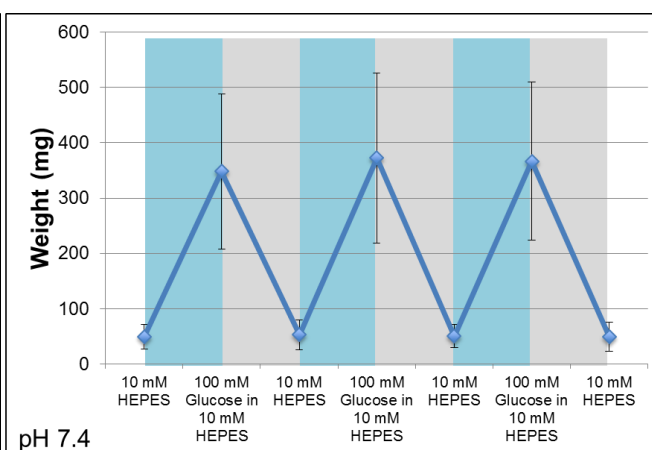


Fig. 66. Weight changes of PBA-PAAm-PRXgel in the presence and absence of glucose (100 mM) in HEPES (10 mM, pH 7.4).

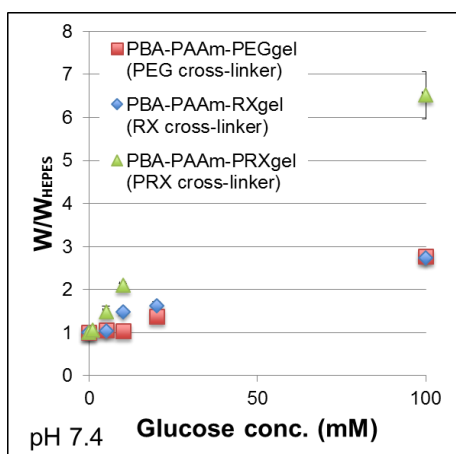


Fig. 65. Weights of PBA-PAAm-PRXgel, PBA-PAAm-RXgel and PBA-PAAm-PEGgel in the presence and absence of glucose in HEPES (10 mM, pH 7.4).

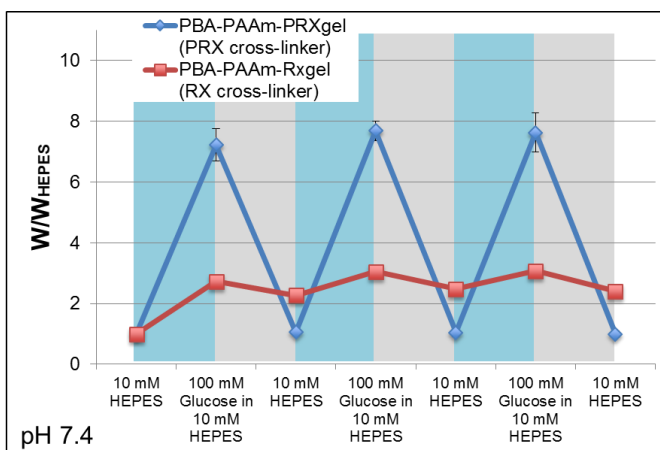


Fig. 67. Weight changes of PBA-PAAm-PRXgel and PBA-PAAm-RXgel in the presence and absence of glucose (100 mM) in HEPES (10 mM, pH 7.4).

この繰り返しの応答性の違いに関する考察を以下に示す。PBA-PAAm-RXgelでは、グルコースにより膨潤したときに架橋のロタキサン構造が伸びきってしまい、グルコースを取り除いても CyD の位置が元に戻らないため、初期質量に戻らないと考えられる (Fig. 68)。一方、PBA-PAAm-PRXgelでは、膨潤した際にひずみが生じるため、グルコースを取り除いた後に、このひずみを戻そうと CyD の位置が元の状態に戻ると考えられた。

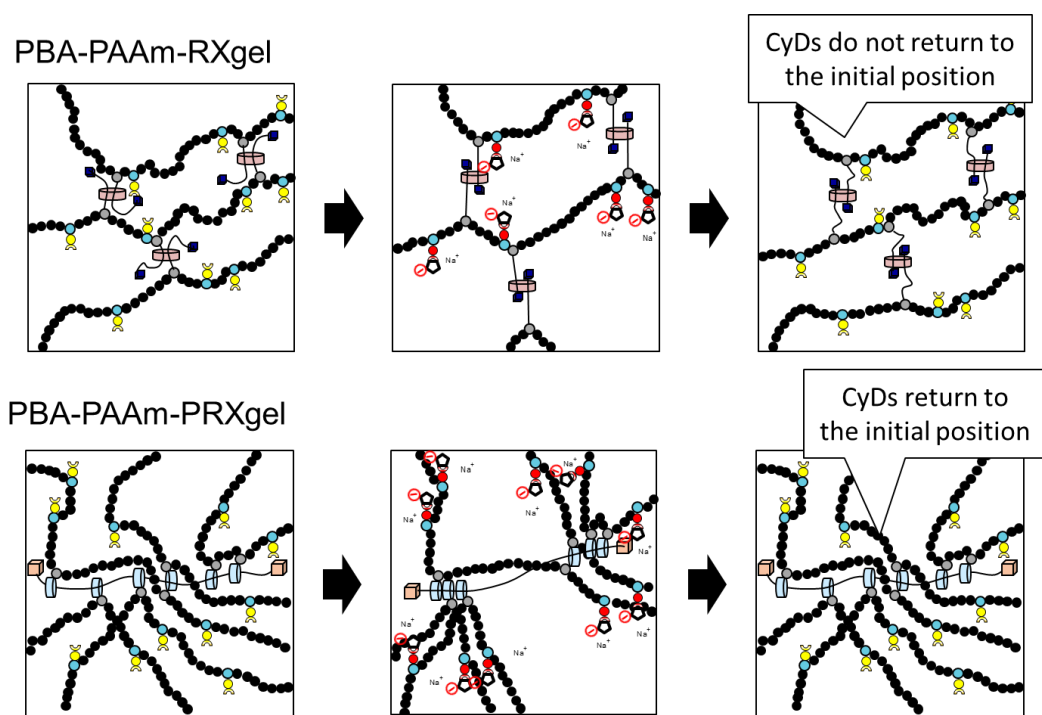


Fig. 68. Mechanisms for repeated response of PBA-PAAm-RXgel and PBA-PAAmPRXgel.

同様な方法で収縮する PBA-DMAP-PAAm-PRXgel の調製も行った (Fig. 69)。DMSO に各種モノマーとビニル基をもつ PRX、開始剤である AIBN を溶かし、60°C で 24 時間ゲル化させた。PBA-DMAP-PAAm-PRXgel を DMSO 次いで水に浸し、未反応のモノマーを取り除いた。

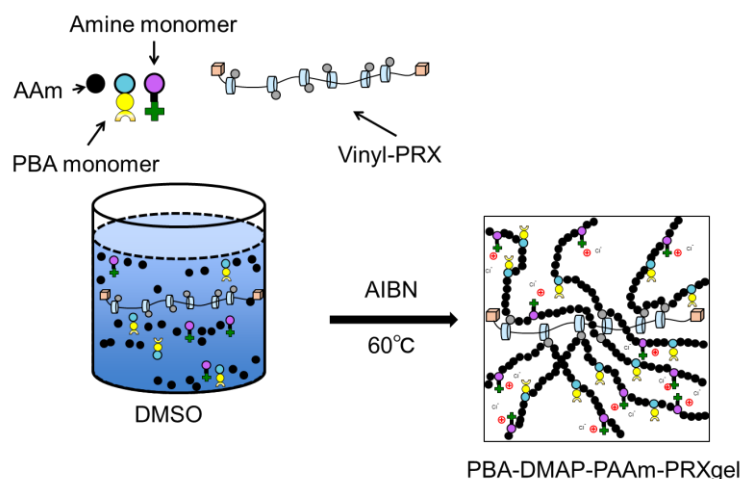


Fig. 69. Schematic representations of preparation of PBA-DMAP-PAAm-PRXgel.

PBA-DMAP-PAAm-RXgel のグルコース応答性を評価するために、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸したゲルを、各種グルコース濃度 (1, 5, 10, 100 mM) の HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に浸し、ゲルの質量変化を測定した (Fig. 70)。PBA-DMAP-PAAm-PRXgel は、グルコース濃度に依存した質量の減少が観察された。PBA-DMAP-PAAm-PEGgel・PBA-DMAP-PAAm-RXgel と比較して、PBA-DMAP-PAAm-PRXgel は、低いグルコース濃度 (1~10 mM) で収縮した (Fig. 71)。架橋がポリロタキサン構造からなるゲルは、広い濃度範囲でグルコース濃度における収縮性が改善された。さらに、繰り返しの応答性を評価するために、グルコース非含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) とグルコース (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に繰り返し浸し、質量変化を測定した (Fig. 72)。グルコースの有無を繰り返すことで、質量の増減が観察され、ゲルが収縮-膨潤の繰り返し応答を示すことが明らかとなった。しかし、収縮の程度は、初回が最も高く、グルコースを含まない緩衝液に浸しても初期質量に完全には戻らなかった。PBA-DMAP-PAAm-RXgel と繰り返しの応答性を比較すると、PBA-DMAP-

PAAm-RXgel では W / W_{HEPES} が $1.0 \rightarrow 0.11 \rightarrow 0.37$ と変化した、PBA-DMAP-PAAm-PRXgel は W / W_{HEPES} が $1.0 \rightarrow 0.13 \rightarrow 0.55$ と変化した (Fig. 73)。すなわち、架橋部に PRX を導入することで、ロタキサン架橋の場合と比較してより優れた繰り返し応答を示した。

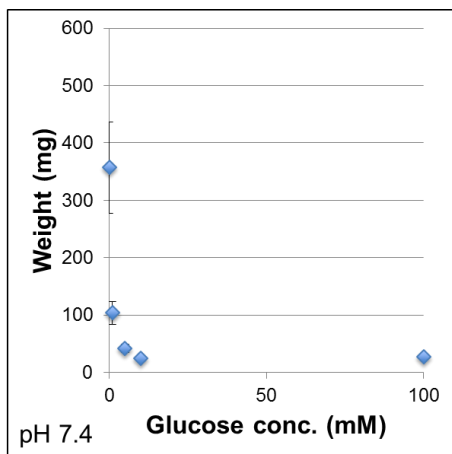


Fig. 70. Weights of PBA-DMAP-PAAm-PRXgel in the presence and absence of glucose in HEPES (10 mM, pH 7.4).

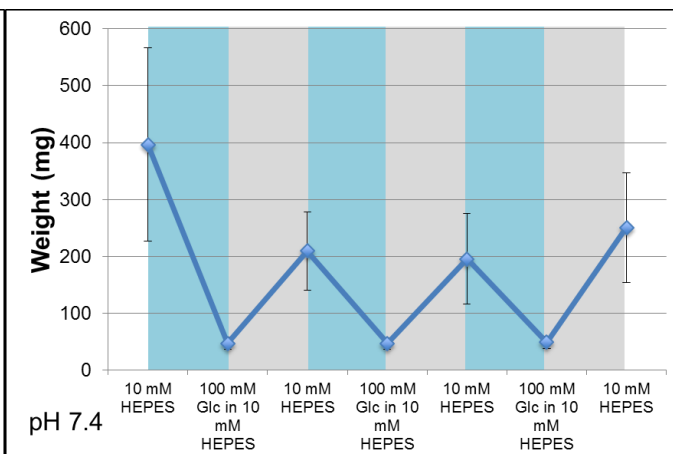


Fig. 72. Weight changes of PBA-DMAP-PAAm-PRXgel in the presence and absence of glucose (100 mM) in HEPES (10 mM, pH 7.4).

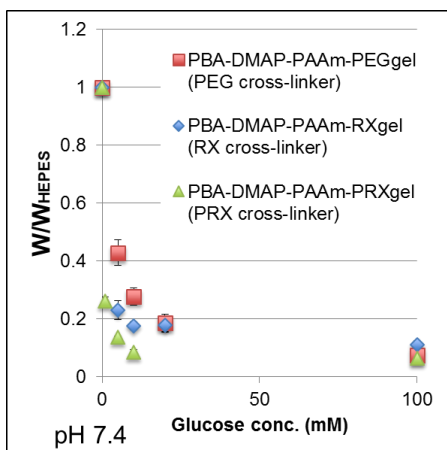


Fig. 71. Weights of PBA-DMAP-PAAm-PRXgel, PBA-DMAP-PAAm-RXgel and PBA-DMAP-PAAm-PEGgel in the presence and absence of glucose in HEPES (10 mM, pH 7.4).

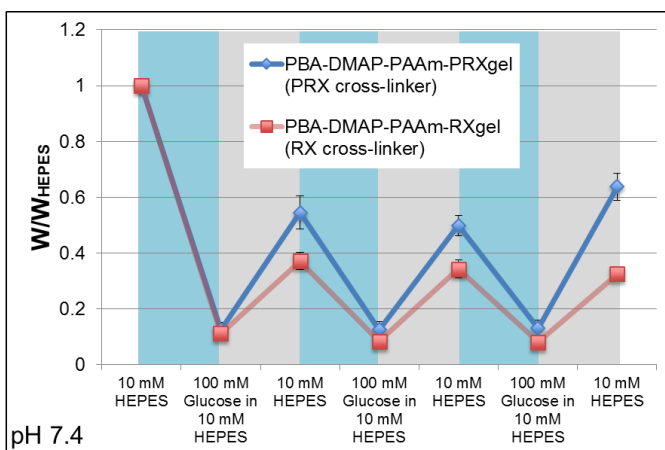


Fig. 73. Weight changes of PBA-DMAP-PAAm-PRXgel and PBA-DMAP-PAAm-RXgel in the presence and absence of glucose (100 mM) in HEPES (10 mM, pH 7.4).

第3節 小括

第4章では、応答性の向上やより良い繰り返し応答性を目指し、架橋部へ CyD の組み込みを行った結果を記述した。架橋部へ CyD を組み込むことにより、大きな膨潤もしくは収縮応答を示すゲルが得られた。架橋部分にロタキサン構造を有するゲルは、初回の応答は大きいものの、一度膨潤したのちには架橋部が伸びた状態で維持されてしまい、繰り返し時のレスポンスは低下した。一方、架橋部分にポリロタキサン構造を有するゲルは、膨潤もしくは収縮によって生じたひずみを戻そうとする力が働くため、より良い繰り返し応答性を示すことが明らかとなった。

結論

第1章では、高分子鎖の末端に PBA を導入した PBA-PEG を用いて、刺激応答性材料の調製を行った結果を記述した。PBA-PEG と PVA を組み合わせることにより、グルコースにより崩壊するゲルが得られた。また、PBA-PEG と CyD を組み合わせることにより、グルコースにより溶解性が変化する pPRX が得られた。しかし、pPRX をゲル化させることは、溶解性の制御が困難であったことから、達成できなかった。

第2章では、ゲルの主鎖構造中に PBA を導入したグルコース応答性ゲルの調製を行った結果を記述した。主鎖に導入する官能基の構成を変えることで、グルコースに反応して膨潤または収縮するゲルが調製可能であることが示された。また、これらのゲルを用いて、グルコースメーターやゲルバルブのようなマシンの作製が可能であることを示した。

第3章では、ゲルの架橋点に PBA を導入したグルコース応答性 SRgel の調製を行った結果を記述した。架橋点に PBA を導入してもグルコースに反応して膨潤するゲルが調製可能であることが示された。また、構造破壊において、スライドラリング架橋に関連すると思われる特異な挙動を示すことを明らかとした。

第4章では、応答性の向上やより良い繰り返し応答性を目指して、CyD を利用した結果について記述した。すなわち、架橋構造に CyD を組み込むことによって、架橋構造が伸びるゲルを作製した。その結果として、膨潤および収縮の応答性が向上することが示された。さらに、ポリロタキサン構造を架橋点に用いることによって、ひずみを元に戻そうという効果が加わり、繰り返し応答性が改善されることが示された。

これらの成果をもとに、グルコースへの結合性の改善や架橋密度の最適化を行うことで、より高い機能を有する刺激応答性ゲルの調製が可能と考えられる。

最後に、本研究で得られたゲルは、その性能を向上させることによって、薬学分野で以下のような応用が考えられる。すなわち、グルコースに応答して収縮するゲルと膨潤するゲルを組み合わせることによるステロイドや向精神薬などを服用中の患者に生じる薬剤性高血糖の副作用発現をチェックする血糖測定マシンや、インスリンなどの血糖降下薬を含有または保持させておき、グルコースに応答して崩壊もしくは収縮するゲルからなるゲルバルブを含む薬物放出マシンなどへの応用が可能と期待できる。

謝辞

本研究の遂行および本論文の作成に際し、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学薬学部 関 俊暢教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、ご親切なご指導、ご助言を賜りました城西大学薬学部 杉田義昭教授並びに真野 博教授に深謝の意を表します。

本研究に際し、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学薬学部 江川祐哉准教授に深謝の意を表します。

本研究に際し、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学薬学部 三木涼太郎助手に深謝の意を表します。

有益なるご意見並びに実験に際しご協力頂きました城西大学薬学部薬品物理化学研究室諸氏に深く感謝いたします。

最後に、博士課程に進学する機会を与えてくださり、また、日々私の健康を気遣い、温かく応援して下さった両親と兄に心より感謝いたします。

実験の部

第 1 章 両末端 PBA 修飾 polyethylene glycol (PBA-PEG) の刺激応答性材料としての評価

1. 実験材料

Polyvinyl alcohol (n=2000, PVA) と glucose、catechol は、和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。*p*-Carboxyphenylboronic acid と pentaerythritol (PE)、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) は、東京化成株式会社 (東京) より購入した。2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES)、pyridine (anhydrous) は、Sigma-Aldrich Japan (東京) より購入した。 α -Aminopropyl- ω -aminopropoxy, polyoxyethylene (SUNBRIGHT® DE-020PA, Amino-PEG) は、日油株式会社 (東京) より購入した。 α -Cyclodextrin (α -CyD) と γ -CyD は、純正化学株式会社 (東京) より購入した。その他すべての試薬は、特級で購入し、精製せずに使用した。

2. NMR 測定

$^1\text{H-NMR}$ は、Varian 400-MR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いた。

3. 両末端 PBA 修飾 PEG の合成

Dichloromethane を magnesium sulfate で脱水した。0°C 下で、脱水した dichloromethane (100 mL) と超脱水 DMSO (25 mL) の混合液に、*p*-carboxyphenylboronic acid (761 mg, 4.6 mmol)、EDC (1.1 g, 5.5 mmol) および pyridine (682 μL) を加えた。この混合物を 15 分間窒素雰囲気下で攪拌した。その後、Amino-PEG (531 mg, 0.25 mmol) を加えた。室温窒素雰囲気下で 3 日間攪拌した。dichloromethane を除去し、残った DMSO 溶液をわずかに酸性の水 (100 mL) と混ぜ、HCl (1.0 M) を加えて、pH を 3.6 にした。不溶性物質を濾過で取り除き、濾液を透析 (MWCO 1000) した。得られた溶液を凍結乾燥し、PBA-PEG (290 mg, 48%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.19–8.14 (s, 3.0 H, BOH), 7.87–7.71 (s, 6.8 H, phenyl-

H), 3.51–3.47 (m, 180 H, PEG).

4. PBA-PEG-PVAgel の調製

PVA 水溶液 (20 mg/mL, 1000 μ L) に PBA-PEG 水溶液 (50 mg/mL, 100 μ L) を加えた。さらに NaOH 水溶液 (40 mg/mL, 10 μ L) を加え、PBA-PEG-PVAgel を得た。

5. PBA-PEG-PVAgel の glucose による崩壊

PBA-PEG-PVAgel (1.1 g) に、glucose (20 mg, 0.11 mmol) を加え、軽く攪拌し、静置した。

6. 粘度測定

粘度測定は、コーンプレート型回転粘度計 RE-215 H (TOKI SANGYO, Tokyo, Japan) を使用した。ローターは、6 番 (3° \times R9.7) を、校正液は、粘度計校正用標準液 JS 14000 (NIPPON GREASE, Kanagawa, Japan) を用いた。測定は、25°C下、サンプル量 0.20 mL、プログラムモードで行った。回転速度と継続時間の条件設定は、上りで、0.1 rpm 600 s \rightarrow 0.2 rpm 300 s \rightarrow 0.4 rpm 300 s \rightarrow 0.8 rpm 150 s \rightarrow 1.6 rpm 80 s \rightarrow 3.2 rpm 40 s、下りで、3.2 rpm 40 s \rightarrow 1.6 rpm 80 s \rightarrow 0.8 rpm 150 s \rightarrow 0.4 rpm 300 s \rightarrow 0.2 rpm 300 s \rightarrow 0.1 rpm 600 s とした。

7. pPRX(CyD/PBA-PEG) の調製

H₂O (1.0 mL) に PBA-PEG (13 mg, 5.5 mmol) と α -CyD (120 mg, 123 mmol) を溶解し、室温で 3 日間静置した。生じた沈殿をろ取り、真空乾燥して pPRX(α -CyD/PBA-PEG) (39 mg) を得た。¹H-NMR によって、被覆率を算出した。CyD の H-1 の積分値を 6.00 にしたとき、PEG の積分値は、12.6 であり、エチレングルコールユニットと α -CyD は 3.2:1.0 であった。100% の被覆率では、この値が 2.0:1.0 となることから、一本鎖として被覆率は 63% であった。

同様なような方法で、H₂O (1.0 mL) に PBA-PEG (34 mg, 14 mmol) と γ -CyD (200 mg, 154 mmol) を混合し、pPRX(γ -CyD/PBA-PEG) (199 mg) を得た。¹H-NMR スペクトルにおいて、CyD の積分値を 8.00 としたとき、PEG の積分値は、18.5 であり、エチレングルコールユニットと γ -CyD は 4.6:1.0 であった。このことから、二本鎖として被覆率は 87% であった。

8. 示差走査熱量測定

示差走査熱量測定は、Thermo Plus 2 series (Rigaku Corporation, Tokyo, Japan) を用いた。サンプルは、窒素雰囲気下アルミパン内で、昇温速度 5 K/min で加熱した。

9. 粉末 X 線回折測定

粉末 X 線回折測定は、Mini FlexII (Rigaku Corporation, Tokyo, Japan) を用いた。30 kV CuK α 線を用いて、走査速度 4°/min、 $2\theta=2-39^\circ$ の範囲で行った。

10. ジオール添加による濁度変化測定

濁度変化の測定は、V-530 UV-vis spectrometer (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) を用いて波長 700 nm で行った。37°C下で、石英セルに HEPES 緩衝液 (20 mM, 2.0 mL, pH 7.4) を加え攪拌した。吸光度が約 2 で安定するまで、ここに pPRX(α -CyD/PBA-PEG) (100-125 mg) を加えた。10 分ごとに少量のジオール溶液 (glucose or catechol, 1.0 M) を添加することで、溶液中ジオール濃度を上昇させた。

同様な方法で pPRX(γ -CyD/PBA-PEG) を用いて濁度変化の測定を行った。吸光度が約 2 で安定するまで、セルに pPRX(γ -CyD/PBA-PEG) (40-43 mg) を加えた。10 分ごとに少量のジオール溶液 (glucose or catechol, 1.0 M) を添加した。

11. pPRX(CyD/PBA-PEG)-PEgel の調製

PBA-PEG (10 mg, 4.1 μ mol) を H₂O (480 μ L) に溶かし、 α -CyD 溶液 (56 mg/mL, 500 μ L, 29 μ mol) を混合した。6 時間静置後、そこに PE 溶液 (28 mg/mL, 20 μ L, 4.1 μ mol) を加え、さらに静置させた。

PBA-PEG (10 mg, 4.1 μ mol) を水 (480 μ L) に溶かし、 γ -CyD 溶液 (36 mg/mL, 500 μ L, 14 μ mol) を混合した。6 時間静置後、そこに PE 溶液 (28 mg/mL, 20 μ L, 4.1 μ mol) を加え、さらに静置した。

第2章 主鎖中にPBAを修飾したアクリルアミドゲルの調製とグルコース応答性

1. 実験材料

Polyethylene glycol (MW 1000, PEG) と acrylamide (AAm)、*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine、ammonium persulfate、fructose は、和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。2-Isocyanatoethyl methacrylate と dibutyltin dilaurate (DBTDL)、3-aminophenylboronic acid monohydrate、acryloyl chloride、*N*-[3-(dimethylamino)propyl]acrylamide (DMAPAAM) は、東京化成株式会社 (東京) より購入した。3,5-Dimethylphenyl isocyanate と *N*-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid (CHES) は、Sigma-Aldrich Japan (東京) より購入した。その他すべての試薬は、特級で購入し、精製せずに使用した。

2. 架橋剤の合成

モレキュラーシーブ 4A を用いて脱水した dichloromethane (50 mL) に PEG (MW1000, 5.0 g, 5.0 mmol) を溶かした。ここに 3,5-dimethylphenyl isocyanate (842 μ L, 6.0 mmol) と DBTDL (191 μ L, 0.32 mmol) を加え、一晩室温で反応させた。続いて、2-isocyanatoethyl methacrylate (846 μ L, 6.0 mmol) と DBTDL (95.2 μ L, 0.16 mmol) を加え、さらに一晩反応させた。溶液を濃縮し、ドライアイスを用いて冷やした過量の diethyl ether に滴下し、沈殿させた。これをろ取り、真空乾燥した。FAB-MS の結果、片末端にかさ高い基、もう片末端にビニル基をもつ DPI-PEG1000-MA と、両末端にビニル基をもつ MA-PEG1000-MA の混合物が得られた。

3. 3-acrylamidophenylboronic acid (3-AAmPBA) の合成

NaOH 水溶液 (2 M, 73 mL) に 3-aminophenylboronic acid monohydrate (5.0 g, 37 mmol) を溶かし、0°Cに冷却した。激しく攪拌しながら、冷やした acryloyl chloride (5.9 mL, 73 mmol) を滴下し、1時間反応させた。pHが1になるまで、塩酸 (1.0 M) を加えた。沈殿物をろ取り、冷水で洗った。濾液中の残留物は、ethyl acetate (100 mL \times 3回) で抽出した。エバポレーターで ethyl acetate を除去した。ろ取および抽出により回収された固体を真空乾燥し、水で再結晶し、精製固体 (2.9 g,

41%) とした。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.08-10.03 (s, 1.0 H, O=CNH), 8.03-7.98 (s, 2.0 H, BOH), 7.87-7.84 (s, 1.0 H, ArH), 7.82-7.77 (d, 1.0 H, ArH), 7.50-7.45 (d, 1.0 H, ArH), 7.30-7.23 (t, 1.0 H, ArH), 6.47-6.38 (dd, 1.0 H, C=CHC=O), 6.27-6.18 (dd, 1.0 H, C=CH₂), 5.75-5.69 (dd, 1.0 H, C=CH₂).

FAB-MS (positive mode, matrix : glycerol) $[\text{M}+\text{H}^+]$: 248 (glycerol との複合体として検出された。)

4. グルコースに応答して膨潤するゲル (PBA-PAAm-PEGgel) の調製

NaOH 水溶液 (0.10 M, 1.0 mL) に、合成した PEG 誘導体混合物 (281 mg) を加え、24 時間攪拌した。ここに、3-AAmPBA (201 mg, 1.1 mmol)、AAm (672 mg, 9.5 mmol) を加え、さらに 24 時間攪拌した。48 well プレートに混合液 (200 μL) を分注し、そこに、*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (5.0 μL , 33 μmol) と ammonium persulfate 水溶液 (150 mg/mL, 13.3 μL , 8.7 μmol) を加え 24 時間ゲル化させた。ゲルを水 (50 mL) に 24 時間浸し、未反応のモノマーを取り除いた。

5. PBA-PAAm-PEGgel のグルコース応答性の評価

水で洗浄した PBA-PAAm-PEGgel を HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) に浸した。次いで、glucose (5.0, 10, 20 or 100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) に浸し、24 時間後のゲル質量をそれぞれ測定した。

6. PBA-PAAm-PEGgel の繰り返し応答性の評価

PBA-PAAm-PEGgel を水で洗浄後、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) と glucose (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) を 24 時間ごとに交互に浸した。溶液は毎回新しいものを使用し、溶液を変える前のゲル質量をそれぞれ測定した。

7. PBA-PAAm-PEGgel の膨潤メカニズムの検討

水で洗浄した PBA-PAAm-PEGgel を HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) に浸した。次いで、CHES 緩衝液 (10 mM, pH 9.0, 50 mL) に浸し、24 時間後のゲル質量をそれぞれ測定した。

8. グルコースに応答して収縮するゲル (PBA-DMAP-PAAm-PEGgel) の調製

NaOH 水溶液 (0.1 M, 1 mL) に、合成した PEG 誘導体混合物 (281 mg) を加え、24 時間攪拌した。ここに、3-AAmPBA (201 mg, 1.1 mmol)、DMAPAAm (172 μ L, 1.1 mmol)、AAm (597 mg, 8.4 mmol) を加え、さらに 24 時間攪拌した。48 well プレートに混合液 (200 μ L) を分注し、そこに、*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (5.0 μ L, 33 μ mol) と ammonium persulfate 水溶液 (150 mg/mL, 13.3 μ L, 8.7 μ mol) を加え 24 時間ゲル化させた。ゲルを水 (50 mL) に 24 時間浸し、未反応のモノマーを取り除いた。

9. PBA-DMAP-PAAm-PEGgel のグルコース応答性の評価

PBA-PAAm-PEGgel と同様な方法で行った。

10. PBA-DMAP-PAAm-PEGgel の繰り返し応答性の評価

PBA-DMAP-PAAm-PEGgel を水で洗浄後、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) に浸した。その後、glucose (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) →塩酸 (10 mM, 50 mL) →HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) の順に 24 時間間隔で繰り返し外液を変えた。溶液は毎回新しいものを使用し、溶液を変える前のゲル質量をそれぞれ測定した。

11. PBA-DMAP-PAAm-PEGgel の収縮メカニズムの検討

水で洗浄した PBA-DMAP-PAAm-PEGgel を HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) に浸した。次いで、CHES 緩衝液 (10 mM, pH 9.0, 50 mL) に浸し、24 時間後のゲル質量をそれぞれ測定した。

水で洗浄した PBA-PAAm-PEGgel を HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) に浸した。次いで、fructose (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) に浸し、24 時間後のゲル質量をそれぞれ測定した。

12. グルコースメーターの作製

アクリル管 (外径 : 16 mm, 内径 : 12 mm, 長さ : 28 mm) の上部に軸を入れる穴を 1 つ、下部に溶液と接触させるための多数の穴をあけた。内径 13 mm のパンチでくり抜いた PBA-PAAm-PEGgel と PBA-DMAP-PAAm-PEGgel をアクリル

管内に設置した。この装置を glucose (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) に入れ、次いで glucose (200 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) に浸し、軸の動きを観察した。

13. ゲルバルブの作製

ガラス管 (外径 : 13 mm, 内径 : 11 mm, 長さ : 112 mm) に内径 11 mm のパンチでくり抜いた PBA-DMAP-PAAm-PEGgel を加え、ゲルが落ちないように下に網を設置した。HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 5.0 mL) を加え、漏れが生じないことを確認した後、溶液を取り除いた。次いで、glucose (0,10 or 100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 5.0 mL ずつ 20 mL まで) を加え、時間ごとの滴下量を測定した。

14. 架橋部位にロタキサン構造を持つように設計したゲル (PBA-PAAm-MIXgel) の調製

γ -CyD (99 mg, 76 μ mol) 含有 NaOH 水溶液 (0.10 M, 1.0 mL) に、合成した PEG 誘導体混合物 (281 mg) を加えて 24 時間攪拌し、PEG を 2 本含むシュードロタキサン構造を持つ架橋剤を調製した。ここに、3-AAmPBA (201 mg, 1.1 mmol)、AAm (672 mg, 9.5 mmol) を加え、さらに 24 時間攪拌した。48 well プレートに混合液 (200 μ L) を分注し、そこに、*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (5.0 μ L, 33 μ mol) と ammonium persulfate 水溶液 (150 mg/mL, 13.3 μ L, 8.7 μ mol) を加え 24 時間ゲル化させた。ゲルを水 (50 mL) に 24 時間浸し、未反応のモノマーを取り除いた。

15. PBA-PAAm-MIXgel の繰り返し応答の評価

PBA-DMAP-PAAm-PEGgel と同様な方法で行った。

第3章 架橋点にPBAを修飾したスライドラングゲル (PBA-SRG) の調製とグルコース応答性

1. 実験材料

PEG (MW 20000) と sodium bromide、sodium hypochlorite solution (NaClO)、1-adamantanamine、BOP reagent、potassium carbonate は、和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl free radical (TEMPO) と *N,N*-diisopropylethylamine、cyanuric chloride は、東京化成株式会社 (東京) より購入した。3-Aminophenylboronic acid hemisulfate は、Sigma-Aldrich Japan (東京) より購入した。その他すべての試薬は、特級で購入し、精製せずに使用した。

2. PEG-carboxylic acid (PEG20000-COOH) の合成

H₂O (200 mL) に PEG (MW 20000, 20 g, 1.0 mmol)、TEMPO (350 mg, 2.2 mmol) と sodium bromide (350 mg, 3.4 mmol) を溶かした。ここに NaClO (35 mL, 24 mmol) を加え、pH 10-11 で 15 分間反応させた。反応を止めるために ethanol (35 mL) を加え、HCl (1.0 M) で pH を 2 以下にした。chloroform (200 mL×3 回) で抽出し、エバポレーターで溶媒を除去した。真空乾燥後、60°C に温めた ethanol (300 mL) に溶かして、再結晶した (18 g, 92%)。

3. ポリロタキサン (PRX) の合成

H₂O (200 mL) に α -CyD (24 g, 25 mmol) を 80°C で溶かした。ここに、PEG20000-COOH (6.0 g, 0.30 mmol) を溶かし、一晩冷蔵庫に入れた。凍結乾燥し、pPRX を得た。超脱水の DMF (200 mL) に凍結乾燥した pPRX (28 g)、1-adamantanamine (320 mg, 2.1 mmol)、BOP reagent (960 mg, 2.2 mmol) と *N,N*-diisopropylethylamine (380 μ L, 2.2 mmol) を加え、4°C で一晩反応させた。遠心分離機を用いて、DMF:methanol (1:1, v/v) で 2 回、methanol で 2 回洗浄した。洗浄した PRX を DMSO (200 mL) に溶かし、H₂O (2000 mL) に滴下し、遠心分離機で回収した。水で数回洗浄し、凍結乾燥し、固体 (19 g, 67%) を得た。

4. PBA-SRgel の調製

脱水した acetone (25 mL) に potassium carbonate (393 mg, 2.8 mmol)、3-aminophenylboronic acid hemisulfate (353 mg, 1.9 mmol) と cyanuric chloride (350 mg, 1.9 mmol) を加え、氷冷下 50 分反応させた。エバポレーターで溶媒を除去した後、氷冷した NaOH 水溶液 (1.0 M, 5.0 mL) を加え架橋剤溶液 (cyanuric chloride として 70 mg/mL) を得た。48 well プレートに PRX (25 mg) を量り、NaOH 水溶液 (1.0 M, 250 μ L) を加えた。ここに架橋剤溶液 (250 μ L) を加え、24 時間ゲル化させた。ゲルを H₂O/ethanol (1:1, v/v, 50 mL) に 24 時間浸し、未反応物を取り除いた。

5. 糖応答性の評価

H₂O/ethanol (1:1, v/v) で洗浄した PBA-SRgel を CHES 緩衝液 (10 mM, pH 9.0, 50 mL) に浸した。次いで、glucose (100 mM) 含有 CHES 緩衝液 (10 mM, pH 9.0, 50 mL) に浸し、24 時間後のゲル質量をそれぞれ測定した。

H₂O/ethanol (1:1, v/v) で洗浄した PBA-SRgel を HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) に浸した。次いで、fructose (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) に浸し、24 時間後のゲル質量をそれぞれ測定した。

6. 機械的強度の測定

測定には、RHEO MATER NRM-2002 J (RHEOTECH, Tokyo, Japan) を用いた。

同一ひずみを繰り返し加える測定は、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) または fructose (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) に浸した PBA-SRgel を、ステージ移動速度 2 cm/min でひずみ 1.0 mm を繰り返し与える条件で行った。プローブは、先端が球 (d = 5.0 mm) の形になっているものを用いた。

等速度でひずみを増加させる測定は、fructose (100 mM) 含有 HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 50 mL) に浸した PBA-SRgel または PBA-PAAm-PEGgel にステージ移動速度 5 cm/min でひずみを増加させる条件で行った。プローブは、円筒形 (d = 3.0 mm) のものを用いた。

第4章 架橋部分がスライドして伸縮するゲルの調製とグルコース応答性

1. 実験材料

2,6-Di-*tert*-butyl-*p*-cresol と 2-isocyanatorthyl acrylate、2,2'-azobis(isobutylnitrile) (AIBN) は、東京化成株式会社 (東京) より購入した。ポリエチレングルコールメタクリレート (MW 500, MA-PEG) は、Sigma-Aldrich Japan (東京) より購入した。その他すべての試薬は、特級で購入し、精製せずに使用した。

2. 架橋剤の合成

モレキュラーシーブ 4A を用いて脱水した dichlorometane (50 mL) に MA-PEG (MW 500, 9.1 mL, 20 mmol) を溶かした。ここに 3,5-Dimethylphenyl isocyanate (5.63 μ L, 20 mmol) と DBTDL (750 μ L, 1.3 mmol) を加え、一晩室温で反応させた。溶液を濃縮し、ドライアイスを用いて冷やした過量の diethyl ether に滴下し、沈殿させた。これをろ取し、真空乾燥した。FAB-MS の結果、片末端にかさ高い基、もう片末端にビニル基をもつ DPI-PEG500-MA (5.4 g, 34%) が得られた。FAB-MS により構造確認した。

3. PBA-PAAm-RXgel の調製

γ -CyD (99 mg, 76 μ mol) 含有 NaOH 水溶液 (0.10 M, 1.0 mL) に、DPI-PEG500-MA (160 mg, 210 μ mol) を加えて 24 時間攪拌し、PEG を 2 本含むシュードロタキサン構造を持つ架橋剤を調製した。ここに、3-AAmPBA (201 mg, 1.1 mmol)、AAm (672 mg, 9.5 mmol) を加え、さらに 24 時間攪拌した。48 well プレートに混合液 (200 μ L) を分注し、そこに、*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (5.0 μ L, 33 μ mol) と ammonium persulfate 水溶液 (150 mg/mL, 13 μ L, 8.7 μ mol) を加え 24 時間ゲル化させた。ゲルを水 (50 mL) に 24 時間浸し、未反応のモノマーを取り除いた。

4. PBA-PAAm-RXgel のグルコース応答の評価

第2章の PBA-PAAm-PEGgel と同様な方法で行った。

5. PBA-PAAm-RXgel の繰り返し応答性の評価

第 2 章の PBA-PAAm-PEGgel と同様な方法で行った。

6. PBA-DMAP-PAAm-RXgel の調製

γ -CyD (99 mg, 76 μ mol) 含有 NaOH 水溶液 (0.10 M, 1.0 mL) に、DPI-PEG500-MA (160 mg, 210 μ mol) を加えて 24 時間攪拌し、PEG を 2 本含むシュードロタキサン構造を持つ架橋剤を調製した。ここに、3-AAmPBA (201 mg, 1.1 mmol)、DMAPAAm (156 μ L, 0.95 mmol)、AAm (597 mg, 8.4 mmol) を加え、さらに 24 時間攪拌した。48 well プレートに混合液 (200 μ L) を分注し、そこに、*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (5.0 μ L, 33 μ mol) と ammonium persulfate 水溶液 (150 mg/mL, 13 μ L, 8.7 μ mol) を加え 24 時間ゲル化させた。ゲルを水 (50 mL) に 24 時間浸し、未反応のモノマーを取り除いた。

7. PBA-DMAP-PAAm-RXgel のグルコース応答の評価

第 2 章の PBA-PAAm-PEGgel と同様な方法で行った。

8. PBA-DMAP-PAAm-RXgel の繰り返し応答性の評価

第 2 章の PBA-PAAm-PEGgel と同様な方法で行った。

9. ビニル化ポリロタキサン (Vinyl-PRX) の合成

超脱水 DMSO (120 mL) に PRX (2 g) と 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol (3.1 mg, 14 μ mol)、DBTDL (4 drop) を加えた。別に超脱水 DMSO (40 mL) に 2-isocyanatorthyl acrylate (276 μ L, 2.2 mmol) を溶かし、前の溶液に滴下した。一晩反応させた後、過量の methanol (2.0 L) に滴下して、グラスフィルターを用いて吸引濾過し、固体 (2.0 g, 87%) を回収した。

10. PBA-PAAm-PRXgel の調製

超脱水 DMSO (5.0 mL) に 3-AAmPBA (191 mg, 1.0 mmol) と AAm (640 mg, 9.0 mmol)、Vinyl-PRX (100 mg)、AIBN (6.7 mg, 41 μ mol) を溶かした。この溶液 (200 μ L) を 48 well プレートに分注し、60°Cで 24 時間ゲル化させた。ゲルを DMSO (50 mL) に 24 時間、次いで、水 (50 mL) に 24 時間浸し、未反応のモノマーを取り除いた。

11. PBA-PAAm-PRXgel のグルコース応答の評価

第 2 章の PBA-PAAm-PEGgel と同様な方法で行った。

12. PBA-PAAm-PRXgel の繰り返し応答性の評価

第 2 章の PBA-PAAm-PEGgel と同様な方法で行った。

11. PBA-DMAP-PAAm-PRXgel の調製

超脱水 DMSO (5.0 mL) に 3-AAmPBA (191 mg, 1.0 mmol) と DMAPAAm (164 μ L, 1.0 mmol)、AAm (569 mg, 8.0 mmol)、Vinyl-PRX (100 mg)、AIBN (6.7 mg, 41 μ mol) を溶かした。この溶液 (200 μ L) を 48 well プレートに分注し、60°Cで 24 時間ゲル化させた。ゲルを DMSO (50 mL) に 24 時間、次いで、水 (50 mL) に 24 時間浸し、未反応のモノマーを取り除いた。

13. PBA-DMAP-PAAm-PRXgel のグルコース応答の評価

第 2 章の PBA-PAAm-PEGgel と同様な方法で行った。

14. PBA-DMAP-PAAm-PRXgel の繰り返し応答性の評価

第 2 章の PBA-PAAm-PEGgel と同様な方法で行った。

参考文献

1. 新村出 (編) (2008). 広辞苑第六版 岩波書店, 東京
2. 長田義仁・梶原莞爾 (編) (1997). 普及版ゲルハンドブック エヌ・ティー・エス, 東京
3. M. E. Harmona, M. Tang and C. W. Frank, A microfluidic actuator based on thermoresponsive hydrogels, *Polymer*, 44, 4547-4556 (2003)
4. D. Kuckling, A. Richter and K.-F. Arndt, Temperature and pH-dependent swelling behavior of poly(*N*-isopropylacrylamide) copolymer hydrogels and their use in flow control, *Macromol. Mater. Eng.*, 288, 144-151 (2003)
5. A.-L. Chen, H.-R. Yu, X.-J. Ju, R. Xie, W. Wang and L.-Y. Chu, Visual detection of lead (II) using a simple device based on P(NIPAM-co-B18C6Am) hydrogel, *RSC Adv.*, 4, 26030-26037 (2014)
6. D. Morales, E. Palleau, M. D. Dickey and O. D. Velev, Electro-actuated hydrogel walkers with dual responsive legs, *Soft Matter*, 10, 1337-1348 (2014)
7. S. Sugiura, K. Sumaru, K. Ohi, K. Hiroki, T. Takagi and T. Kanamori, Photoresponsive polymer gel microvalves controlled by local light irradiation, *Sensors and Actuators A*, 140, 176-184 (2007)
8. T. Sakai, H. Murayama, S. Nagano, Y. Takeoka, M. Kidowaki, K. Ito and T. Seki, Photoresponsive slide-ring gel, *Adv. Mater.*, 19, 2023-2025 (2007)
9. P. Techawanitchai, M. Ebara, N. Idota, T. Asoh, A. Kikuchi and T. Aoyagi, Photo-switchable control of pH-responsive actuators via pH jump reaction, *Soft Matter*, 8, 2844-2851 (2012)
10. D. J. Beebe, J. S. Moore, J. M. Bauer, Q. Yu, R. H. Liu, C. Devadoss and B.-H. Jo, Functional hydrogel structures for autonomous flow control inside microfluidic channels, *Nature*, 404, 588-590 (2000)
11. M. Nakahata, Y. Takashima, A. Hashidzume and A. Harada, Redox-generated mechanical motion of a supramolecular polymeric actuator based on host-guest interactions, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 5731-5735 (2013)
12. R. A. Siegel, Y. Gu, A. Balidi and B. Ziaie, Novel swelling/shrinking behaviors of glucose-binding hydrogels and their potential use in a microfluidic insulin delivery System. *Macromol. Symp.*, 207, 249-256 (2004).
13. T. Miyata, N. Asami and T. Urugami, Preparation of an antigen-sensitive hydrogel using antigen-antibody bindings, *Macromolecules*, 32, 2082-2084 (1999)

14. T. Miyata, M. Jige, T. Nakaminami and T. Uragami, Tumor marker-responsive behavior of gels prepared by biomolecular imprinting, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103, 1190-1193 (2006)
15. A. Kawamura, T. Kiguchi, T. Nishihara, T. Uragami and T. Miyata, Target molecule-responsive hydrogels designed via molecular imprinting using bisphenol A as a template, *Chem. Comm.*, 50, 11101-11103 (2014)
16. Y. Shiraki, K. Tsuruta, J. Morimoto, C. Ohba, A. Kawamura, R. Yoshida, R. Kawano, T. Uragami and T. Miyata, Preparation of molecule-responsive microsized hydrogels via photopolymerization for smart microchannel microvalves, *Macromol. Rapid Commun.*, 36, 515-519 (2015)
17. S. Maeda, Y. Hara, T. Sakai, R. Yoshida and S. Hashimoto, Self-walking gel, *Adv. Mater.*, 19, 3480-3484 (2007)
18. A. Harada, J. Li and M. Kamachi, The molecular necklace: a rotaxane containing many threaded α -cyclodextrins, *Nature*, 356, 325-327 (1992)
19. Y. Akae, T. Arai, Y. Koyama, H. Okamura, K. Johmoto, H. Uekusa, S. Kuwata and T. Takata, One-pot synthesis of permethylated α -CD-based rotaxanes having alkylene chain axles and their structural characteristics, *Chem. Lett.*, 41, 806-808 (2012)
20. J. Watanabe, T. Ooya and N. Yui, Preparation and characterization of a polyrotaxane with non-enzymatically hydrolyzable stoppers, *Chem. Lett.*, 27, 1031-1032 (1998)
21. T. Higashi, J. Li, X. Song, J. Zhu, M. Taniyoshi, F. Hirayama, D. Iohara, K. Motoyama and H. Arima, Thermoresponsive formation of dimethyl cyclodextrin polypseudorotaxanes and subsequent one-pot synthesis of polyrotaxanes, *ACS Macro Lett.*, 5, 158-162 (2016)
22. S. Liu, J. Cai, L. Ren, L. Wang and Y. Wang, β -Cyclodextrin polyrotaxane monoaldehyde: a novel bio-crosslinker with high biocompatibility, *RSC Adv.*, 4, 18608-18611 (2014)
23. H. Iguchi, S. Uchida, Y. Koyama and T. Takata, Polyester-containing α -cyclodextrin-based polyrotaxane: synthesis by living ring-opening polymerization, polypseudorotaxanation, and end capping using nitrile *N*-oxide, *ACS Macro Lett.*, 2,

- 527–530 (2013)
24. L. Jiang, L. Ye, A. Zhang and Z. Feng, Self-assembly of polyrotaxanes synthesized via click chemistry of azido-encapped PNIPAAm-b-pluronic F68-b-PNIPAAm/ γ -CD with propargylamine-substituted β -CDs, *Macromol. Chem.Phys.*, 215, 1022-1029 (2014)
 25. E. T. Wise and S. G. Weber, A simple partitioning model for reversibly cross-linked polymers and application to the poly(vinyl alcohol)/borate system (“Slime”), *Macromolecules*, 28, 8321-8327 (1995)
 26. Z. A. Nurpeissova, S. G. Alimkhanova, R. A. Mangazbayeva, Y. M. Shaikhutdinov, G. A. Mun and V. V. Khutoryanskiy, Redox- and glucose-responsive hydrogels from poly(vinyl alcohol) and 4-mercaptophenylboronic acid, *Eur. Polym. J.*, 69, 132-139 (2015)
 27. F. García, J. Buendía, S. Ghosh, A. Ajayaghosh and L. Sánchez, Luminescent and conductive supramolecular polymers obtained from an *N*-annulated perylenedicarboxamide, *Chem. Commun.*, 49, 9278-9280 (2013)
 28. 高橋 成周, 安斉 順一, フェニルボロン酸ポリマーとカルボキシメチルセルロースとの交互累積膜を被覆した電極の D - グルコース及び D - フルクトースに対する応答性, *分析化学*, 56, 951-955 (2007)
 29. A. Harada, J. Li and M. Kamachi, Double-stranded inclusion complexes of cyclodextrin threaded on poly(ethylene glycol), *Nature*, 370, 126-128 (1994)
 30. J. Li, A. Harada and M. Kamachi, Sol–gel transition during inclusion complex formation between α -cyclodextrin and high molecular weight poly(ethylene glycol)s in aqueous solution, *Polym. J.*, 26, 1019-1026 (1994)
 31. W. Feng, W. Zhou, Z. Dai, A. Yasin and H. Yang, Tough polypseudorotaxane supramolecular hydrogels with dual-responsive shape memory properties, *J. Mater. Chem. B*, 4, 1924-1931 (2016)
 32. I. I. Abu Hashim, T. Higashi, T. Anno, K. Motoyama, A.-E. H. Abd-ElGawad, M. H. El-Shabouri, T. M. Borg and H. Arima, Potential use of γ -cyclodextrin polypseudorotaxane hydrogels as an injectable sustained release system for insulin, *Inter. J. Pharmaceut.*, 392, 83-91 (2010)
 33. A. Harada, J. Li and M. Kamachi, Formation of Inclusion Complexes of Monodisperse Oligo(ethylene glycol)s with α -Cyclodextrin, *Macromolecules*, 27,

- 4538-4543 (1994)
34. K. Kato, Y. Okabe, Y. Okazumi and K. Ito, A significant impact of host–guest stoichiometry on the extensibility of polyrotaxane gels, *Chem. Commun.*, 51, 16180-16183 (2015)
 35. I. N. Topchieva, A. E. Tonelli, I. G. Panova, E. V. Matuchina, F. A. Kalashnikov, V. I. Gerasimov, C. C. Rusa, M. Rusa and M. A. Hunt, Two-phase channel structures based on α -cyclodextrin-polyethylene glycol inclusion complexes, *Langmuir*, 20, 9036-9043 (2004)
 36. T. Higashi, A. Tajima, N. Ohshita, T. Hirotsu, I. I. Abu Hashim, K. Motoyama, S. Koyama, R. Iibuchi, S. Mieda, K. Handa, T. Kimoto and H. Arima, Design and evaluation of the highly concentrated human IgG formulation using cyclodextrin polypseudorotaxane hydrogels, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 16, 1290-1298 (2015)
 37. T. Seki, M. Namiki, Y. Egawa, R. Miki, K. Juni and T. Seki, Sugar-responsive pseudopolyrotaxane composed of phenylboronic acid-modified polyethylene glycol and γ -cyclodextrin, *Materials*, 8, 1341-1349 (2015)
 38. T. Arai, K. Jang, Y. Koyama, S. Asai and T. Takata, Versatile supramolecular cross-linker: a rotaxane cross-linker that directly endows vinyl polymers with movable cross-links, *Chem. Eur. J.*, 19, 5917-5923 (2013)
 39. S. Li, E. N. Davis, J. Anderson, Q. Lin and Q. Wang, Development of boronic acid grafted random copolymer sensing fluid for continuous glucose monitoring, *Biomacromolecules*, 10, 113-118 (2009)
 40. A. Matsumoto, R. Yoshida and K. Kataoka, Glucose-responsive polymer gel bearing phenylborate derivative as a glucose-sensing moiety operating at the physiological pH, *Biomacromolecules*, 5, 1038-1045 (2004)
 41. A. Matsumoto, S. Ikeda, A. Harada and K. Kataoka, Glucose-responsive polymer bearing a novel pphenylborate derivative as a glucose-sensing moiety operating at physiological pH conditions, *Biomacromolecules*, 4, 1410-1416 (2003)
 42. A. Matsumoto, K. Yamamoto, R. Yoshida, K. Kataoka, T. Aoyagi and Y. Miyahara, A totally synthetic glucose responsive gel operating in physiological aqueous conditions, *Chem. Commun.*, 46, 2203–2205 (2010)
 43. X. Pan, X. Yang and C. R. Lowe, Evidence for a cross-linking mechanism underlying glucose-induced contraction of phenylboronate hydrogel, *J. Mol.*

- Reconit.*, 21, 205-209 (2008)
44. J. P. Lorand and J. O. Edwards, Polyol complexes and structure of the benzenboronate ion, *J. Org. Chem.*, 24, 769-774 (1959)
45. リンテック株式会社. 高分子架橋前駆体、刺激応答性高分子架橋体およびそれらの製造方法. 特開2012-188523. 2012-10-04
46. K. Iijima, D. Aoki, H. Sogawa, S. Asai and T. Takata, Synthesis and characterization of supramolecular cross-linkers containing cyclodextrin dimer and trimer, *Polym. Chem.*, 7, 3492-3495 (2016)
47. Y. Okumura and K. Ito, The polyrotaxane gel: a topological gel by figure-of-eight cross-links, *Adv. Mater.*, 13, 485-487 (2001)
48. J. Araki, C. Zhao and K. Ito, Efficient production of polyrotaxanes from α -cyclodextrin and poly(ethylene glycol), *Macromolecules*, 38, 7524-7527 (2005)
49. A. Kumar, K. Srivastava, S. R. Kumar, M. I. Siddiqi, S. K. Puri, J. K. Sexana and P. M. S. Chauhan, 4-Anilinoquinoline triazines: a novel class of hybrid antimalarial agents, *Eur. J. Med. Chem.*, 46, 676-690 (2011)
50. A. B. Imran, T. Seki, T. Kataoka, M. Kidowaki, K. Ito and Y. Takeoka, Fabrication of mechanically improved hydrogels using a movable cross-linker based on vinyl modified polyrotaxane, *Chem. Comm.*, 41, 5227-5229 (2008)
51. A. B. Imran, T. Seki, K. Ito and Y. Takeoka, Poly(*N*-isopropylacrylamide) gel prepared using a hydrophilic polyrotaxane-based movable cross-linker, *Macromolecules*, 43, 1975-1980 (2010)