

フェニルボロン酸修飾  $\gamma$ -シクロデキストリンを  
架橋剤に用いたハイドロゲルの調製と  
薬物放出制御への利用

内田 亘

# 目次

略語一覧	・・・1
緒言	・・・2
第一章 PBA-CyD を用いた PBA-CyD/PVAgel の調製	・・・8
第一節 PBA-CyD の合成	・・・9
第二節 PBA-CyD/PVAgel の調製	・・・10
小括	・・・12
第二章 PBA-CyD/PVAgel の構造推定	・・・13
第一節 PVA 同士間における相互作用	・・・14
第二節 CyD 部位と PVA 間における相互作用	・・・15
第三節 PBA 部位と PVA 間における相互作用	・・・18
第四節 相互作用を考慮した PBA-CyD/PVAgel の構造推定	・・・20
小括	・・・21
第三章 PBA-CyD/PVAgel の薬物放出制御への利用	・・・22
第一節 フルクトース、グルコース存在下における薬物放出とゲルの崩壊	・・・23
第二節 過酸化水素応答性を利用した刺激応答性薬物放出	・・・26
小括	・・・32
総括	・・・33
実験の部	・・・35
参考文献	・・・40

## 略語一覧

<b>PVA</b>	ポリビニルアルコール
<b>CyD</b>	シクロデキストリン
<b>PBA</b>	フェニルボロン酸
<b>PBA-CyD</b>	フェニルボロン酸修飾 $\gamma$ -シクロデキストリン
<b>PBA-CyD/PVAgel</b>	<b>PBA-CyD</b> と <b>PVA</b> で構成された水ゲル
<b>NOESY</b>	<b>nuclear overhauser effect spectroscopy</b>
<b>FNa</b>	フルオレセインナトリウム
<b>GOx</b>	グルコースオキシダーゼ

## 緒言

ハイドロゲルは、水中において鎖状高分子同士を架橋し、三次元網目構造を形成させることで調製できる (Figure 1)<sup>1)</sup>。鎖状高分子同士の架橋には共有結合などの化学的な結合、もしくは水素結合や静電的引力などの物理的な相互作用が利用され、架橋構造や主鎖と溶媒間の相互作用などが関わり、その組み合わせによって特徴的なハイドロゲルが形成される。化学架橋ゲルは、網目構造の主鎖となるモノマー分子と架橋点となるモノマー分子を共重合する、もしくは多官能性化合物を用いて高分子鎖同士を架橋することで調製される。一方で物理架橋ゲルは、主鎖となる高分子同士間で水素結合を形成させる、もしくは鎖状高分子上に存在する荷電部位と反するイオンを添加して静電的引力を発生させるなど様々な方法で調製される<sup>1,2)</sup>。

本研究で調製を試みたハイドロゲルは、主鎖となる鎖状高分子にポリビニルアルコール (PVA)、架橋点には  $\gamma$ -シクロデキストリン (CyD) とフェニルボロン酸 (PBA) を用いた (Figure 1)。架橋点に用いるこれらの化合物は PVA に対して相互作用を示し、それを利用することで異なる 2つの相互作用により架橋されたハイドロゲルが調製可能であると考えられた。

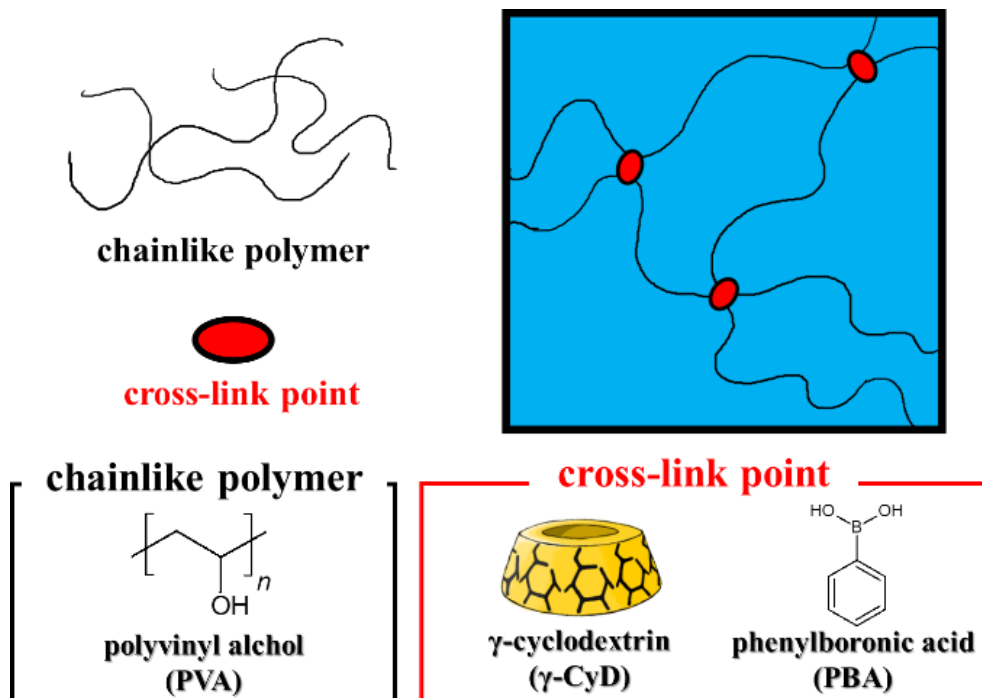


Figure 1. Schematic diagram of hydrogel and hydrogel materials in this study

CyD は、複数の D-グルコースが  $\alpha$ -1,4 グリコシド結合することによって環状構造を形成した分子であり、構成する D-グルコースの数が 6、7、8 個の場合、各々  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -CyD と呼ばれる (Figure 2)<sup>3,4,5,6</sup>。CyD が持つ特徴的な性質として、その環状構造の空洞内に他分子を取り込み、包接複合体を形成することが挙げられる (Figure 3)。環のサイズが  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -CyD 各々で異なることから、取り込まれる分子 (ゲスト分子) には違いはあるが、低分子量のイオンといった極性分子や脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素といった低極性分子など極めて広範囲の分子を包接可能である。また、CyD に官能基を導入することでその包接能を変化させることが可能であり、更に包接能とは別の機能を CyD に付与することも可能である。

CyD は様々な分子を包接するが、その中でも鎖状高分子に対しては 1 分子に対して複数の CyD が包接して包接複合体を形成し、結晶やゲル構造をとることがある<sup>7,8,9,10</sup>。この包接複合体について薬学分野への利用が試みられており、刺激に応答して薬物を放出する薬物担体やペプチド性薬物の安定化と徐放化を目的とした製剤の開発などに利用され、近年報告されている<sup>11,12</sup>。

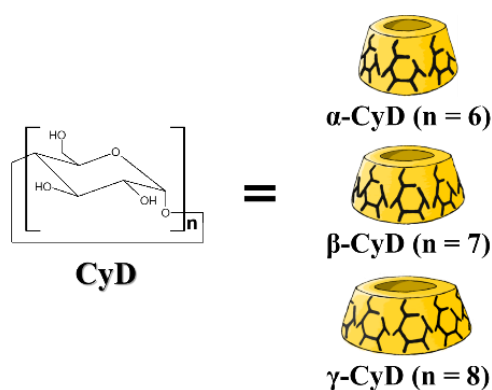


Figure 2. Structure of CyDs

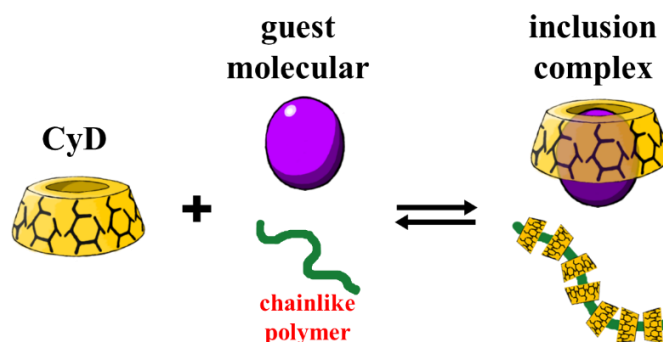


Figure 3. Forming inclusion complex between CyDs and guest molecules

鎖状高分子に対する包接能は水ゲルの架橋点として利用できる<sup>13,14,15,16</sup>。例えば、一分子の CyD が二本の鎖状高分子を包接して架橋する (Figure 4A)、鎖状高分子に CyD を包接させ、その CyD 同士を架橋する (Figure 4B) という方法がある。これらの水ゲルは鎖状高分子と CyD の間に化学的な結合が存在しない。したがって、CyD は鎖状高分子に対して完全には固定されておらず、CyD が鎖状高分子上をスライドして架橋点が移動する。

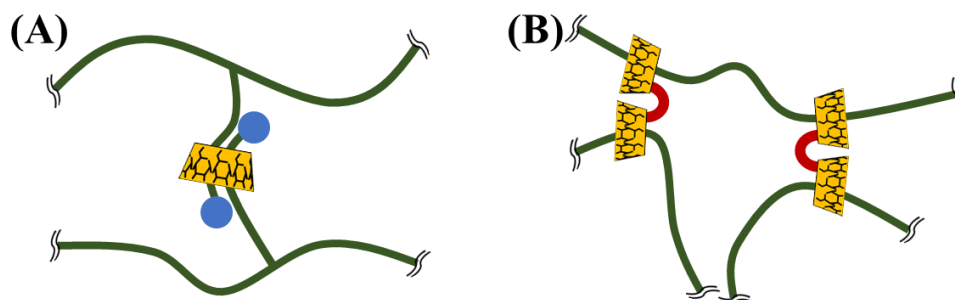


Figure 4. Cross-linking chainlike polymers by CyD

$\gamma$ -CyD は鎖状高分子である PVA と包接複合体を形成することが報告されている (Figure 5)<sup>17</sup>。その報告によると、PVA 水溶液へ  $\gamma$ -CyD を添加して水ゲルを形成させた際には、 $\gamma$ -CyD は PVA を包接した状態で存在していることが示されており、NMR スペクトル、X 線回折パターン、レオロジー特性の変化などから確認されている。

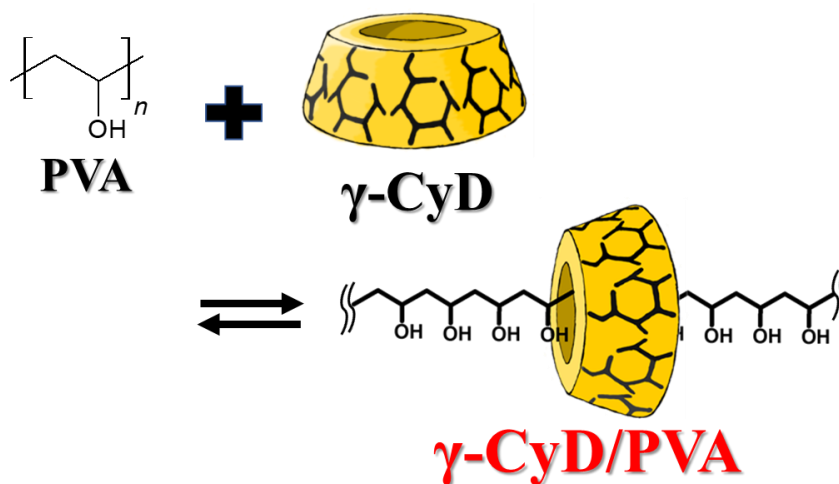


Figure 5. Inclusion complex between PVA and  $\gamma$ -CyD

PBA はベンゼンにホウ酸を導入した構造を持つ  $pK_a$  8.8 のルイス酸である (Figure 6)<sup>18</sup>。本研究では、この化合物がもつ 2 種類の応答性に着目した。一つは、シスジオール構造を持つ分子との可逆的な化学結合の形成である (Figure 7)<sup>19</sup>。この特性は機能性分子の開発に応用され、誘導体化した PBA による糖類のセンサー分子の開発、細胞表面にある糖鎖をターゲットにしたドラッグデリバリーシステムの構築、血糖値の上昇により溶出されるインスリン製剤の開発など多数の報告がある<sup>11,20,21,22,23</sup>。もう一つは、過酸化水素に対する応答性であり、過酸化水素はフェニル基とボロン酸部分を解離させ、シスジオール構造を持つ化合物と結合した PBA をフェノールに変換する (Figure 8)<sup>24</sup>。この応答性を利用したセンサー分子の開発も報告されている<sup>25</sup>。

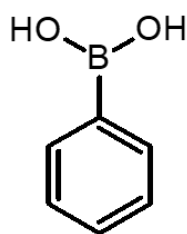


Figure 6. Structure of PBA

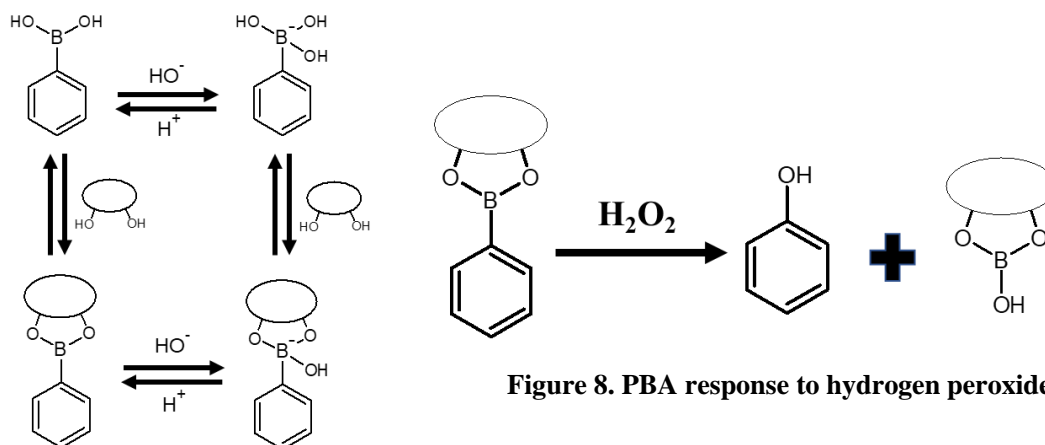


Figure 8. PBA response to hydrogen peroxide

Figure 7. PBA response to *cis*-diol compound

PBA は PVA との間に前述のシスジオール応答性に基づいた化学結合が生じる (Figure 9)<sup>26,27,28,29,30</sup>). PVA の分子内にはシスジオール様構造が繰り返されており、1 分子に対して多数の PBA が結合可能である。形成された PBA/PVA 結合体に対し、別のシスジオール構造を持つ化合物や、過酸化水素を添加することでこの結合体は解離する。

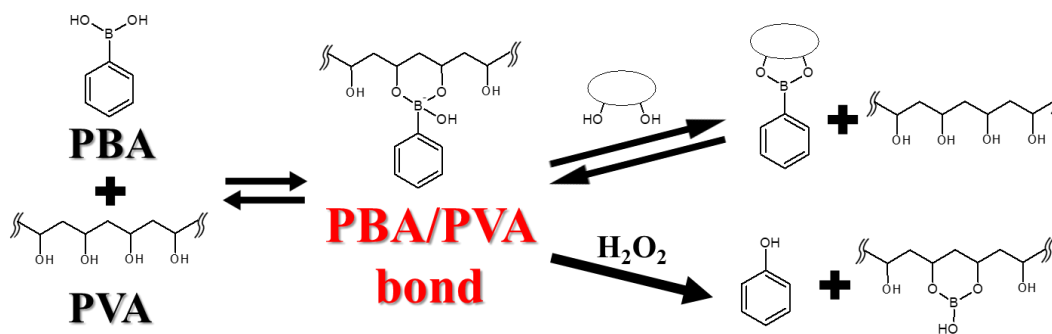


Figure 9. Bond formation and dissociation between PBA and PVA



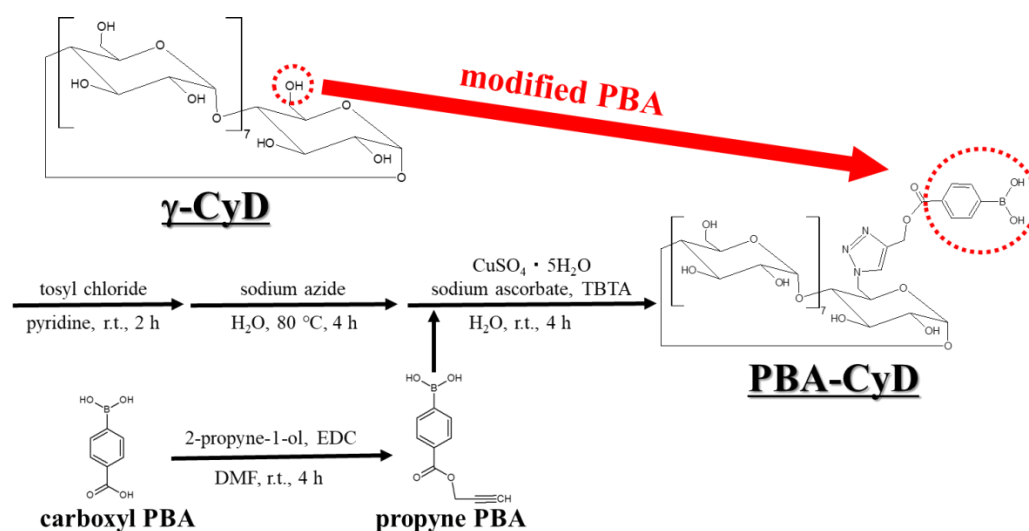
本研究では、PVA に対する  $\gamma$ -CyD と PBA の相互作用を併用した新しい架橋構造を持つハイドロゲル (PBA-CyD/PVAgel) を調製する。第一章では、 $\gamma$ -CyD に対して 1 分子だけ PBA を導入した PBA 修飾  $\gamma$ -CyD (PBA-CyD) を合成し、それを架橋剤として PVA 同士を架橋し、ハイドロゲルを形成させる。PBA-CyD には PVA に対して作用する点が二か所存在し、異なった作用を示す。PBA-CyD の CyD 部位は PVA をその空孔内へ包接して包接複合体を形成し、PBA 部位では PVA に存在するシスジオールに対して化学結合を形成する。これらの結合様式を併用したハイドロゲルの報告は無く、新たな架橋構造をもつハイドロゲルとして提唱できる。第二章では、予想される架橋構造について種々の測定により裏付けを行う。PBA-CyD/PVAgel が PBA の結合により成立するゲルであれば、PBA の特性が付与されたハイドロゲルとなり、シスジオール応答性や過酸化水素応答性を示すはずである。シスジオール構造を持つ化合物 (糖類、カテコールなど) や過酸化水素は生体内で多様な条件下、多様な濃度において存在し得るものであり、それらがターゲットとして成立すれば、センサー分子や薬物担体として薬学分野への利用が期待できる。第三章において PBA-CyD/PVAgel の薬学分野への利用の可能性を調査する一環として、PBA-CyD/PVAgel に対してモデル薬物を封入し、刺激物質が存在した条件下における薬物放出について調査を行う。

## 第一章 PBA-CyD を用いた PBA-CyD/PVAgel の調製

PBA-CyD/PVAgel を調製するにあたり、 $\gamma$ -CyD に対して PBA を 1 分子導入した PBA-CyD を合成する。合成した PBA-CyD と PVA を用いて PBA-CyD/PVAgel を調製する。

## 第一節 PBA-CyD の合成

$\gamma$ -CyD の 6 位炭素の 1 つに対してヒュスゲン環化反応を利用し、PBA を導入した。ヒュスゲン環化反応は、アジドとアルキン間で生じる 1,3-双極子付加反応である。反応過程を以下に示す (Scheme 1)<sup>31,32,33</sup>。初めに  $\gamma$ -CyD の 6 位炭素に対しトシル基を導入し、活性化した後、アジ化ナトリウムを反応させ、 $\gamma$ -CyD にアジド基を導入した。この際にスチレン-ジビニルベンゼン系樹脂 (Diaion HP-20) を用いた精製を行い、 $\gamma$ -CyD に対して官能基が 1 分子だけ導入されたものだけを得ている。carboxyl PBA に対してエステル化反応を利用し、プロパルギル基を導入した。CyD 側のアジド基と PBA 側のプロパルギル基間でヒュスゲン環化反応を行うことより、PBA-CyD を得た。<sup>1</sup>H-核磁気共鳴 (NMR) スペクトル測定と質量分析法により、PBA が 1 分子だけ導入された PBA-CyD が十分な純度で得られたことを確認した<sup>34</sup>。



Scheme 1. Synthesis process of PBA-CyD

## 第二節 PBA-CyD/PVAgel の調製

鎖状高分子として PVA (重合度 500)、架橋剤として合成した PBA-CyD を用いてハイドロゲルを調製した。PBA-CyD が PVA 間の架橋剤として働いた場合、Figure 10 のような架橋構造を形成すると予想された。架橋の一方は PBA-CyD の CyD 部位と PVA 間における包接複合体の形成、もう一方は PBA 部位と PVA 間における化学結合の形成により成立している。いずれの相互作用も水中で PBA-CyD と PVA を混合することで達成されると予想され、触媒や開始剤といった試薬、有機溶媒は不要であり、副生成物も発生しないと考えられた<sup>17,27)</sup>。

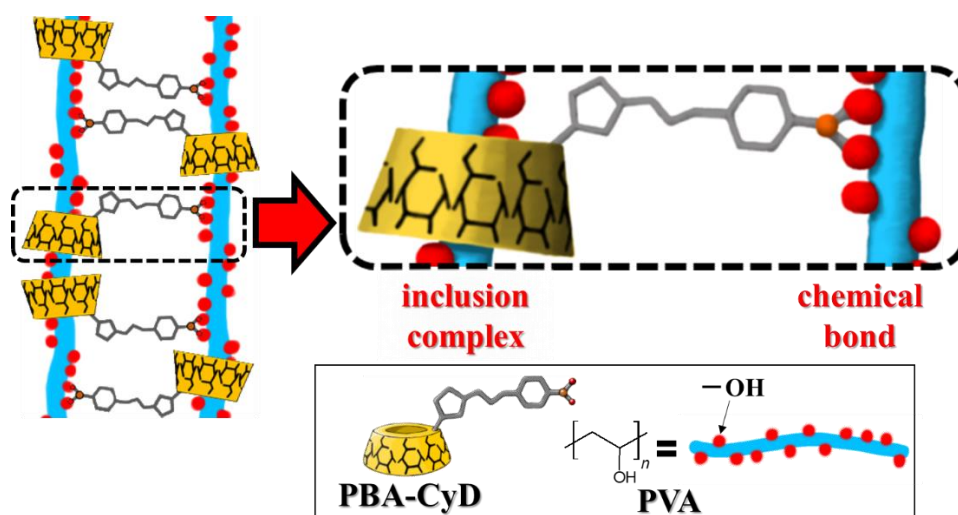


Figure 10. Proposed structure of cross-link in prepared hydrogel

Figure 10 に示す架橋構造をとる場合、架橋剤である PBA-CyD が PVA に対して過剰に存在した時、架橋形成は阻害されると予想した。理由は PBA-CyD の CyD 部位による包接、PBA 部位による化学結合の形成速度が異なると考えられるためである。現在、どちらもどの程度の速さで形成されるかは不明である。PVA が PBA 部位と結合するより先に PVA の大部分が CyD 部位に包接されれば、包接された部分に PBA 部位は結合できないために架橋は成立し難い (Figure 11)。逆の場合では PVA 末端が封鎖され、CyD 部位による包接複合体の形成が阻害される可能性が高い (Figure 12)。

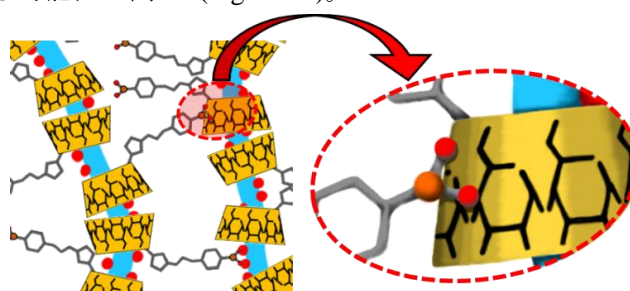
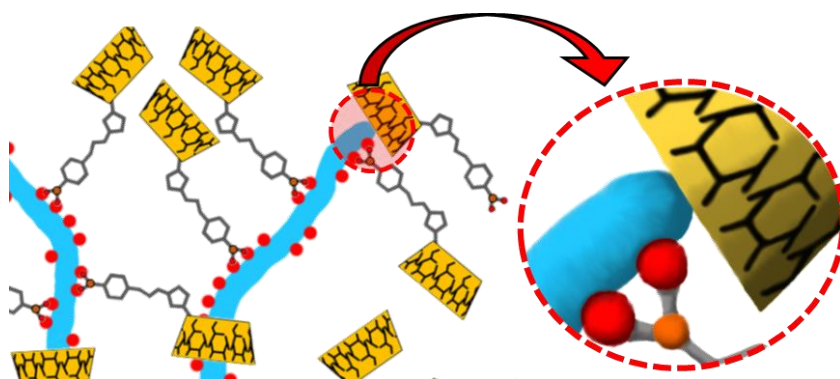


Figure 11. Blocking of formation of chemical bond by formed inclusion complex



**Figure 12. Blocking of formation of inclusion complex by formed chemical bond**

以上を考慮して、試験的な予備調製を行ってハイドロゲルの調製条件を決定し、PVA 水溶液と PBA-CyD 水溶液を混合、20℃下で 14 時間静置することで調製した。水溶液を混合した直後から混合液は白濁し始め、速やかに塊になった。調製した白色の塊の画像と塊中の PVA と PBA-CyD のモル濃度を Figure 13, Table 1 に示した。PVA と PBA-CyD の混合比は、すべての PBA-CyD の CyD 部位が PVA を包接すると仮定した場合に、PVA 全体の 25% を被覆することを想定して決定した。これは、1 分子の CyD が 2 ユニット分のポリエチレングリコールを被覆するという報告から、CyD による PVA の被覆範囲が約 3 ユニット分であるという推測に基づいている<sup>5)</sup>。PVA 水溶液が PBA-CyD 水溶液と混合した直後に塊になったのは、PBA-CyD に存在する 2 点の作用点が関与していると考えられ、PVA 同士が PBA-CyD により架橋され、水を保持して塊が形成されたと予想した。よって、調製された塊は目的のハイドロゲル PBA-CyD/PVAgel であると考えられ、Figure 10 に示した架橋構造を形成している可能性が高い。



**Table 1. Mol concentration of PVA and PBA-CyD in the prepared mixture of PVA aqueous solution and PBA-CyD aqueous solution**

PVA	0.910 (mmol/L)
PBA-CyD	38.0 (mmol/L)

**Figure 13. Picture of the prepared mixture of PVA aqueous solution and PBA-CyD aqueous solution**

## 小括

ヒュスゲン環化反応を利用して、 $\gamma$ -CyD に 1 分子 PBA を導入した新規化合物 PBA-CyD の合成に成功した。合成した PBA-CyD と PVA を水中で混合するという簡易な方法で塊が得られた。この塊は、 $\gamma$ -CyD と PVA の相互作用、PBA と PVA の相互作用により成り立っていると予想され、当初想定していた PBA-CyD/PVAgel であると考えられる。このような架橋構造を持つハイドロゲルの報告は無く、新しい構造のハイドロゲルとして提唱できる。

## 第二章 PBA-CyD/PVAgel の構造推定

第一章において、PBA を導入した CyD を水中で PVA と混合することで水を保持した塊が形成されることを示した。塊が形成されたのは、鎖状高分子である PVA が架橋されたことによると考えられ、また、過去の研究報告において、PVA が  $\gamma$ -CyD と包接複合体を形成すること<sup>17)</sup>、PBA との結合形成が示されていることから、その塊が目的のハイドロゲル PBA-CyD/PVAgel であると予想した<sup>26-30)</sup>。しかし、新規化合物 PBA-CyD が PVA に対して包接複合体、化学結合を形成するかは不明である。そこで、中に含まれる成分から、存在し得る相互作用について調査した (Figure 14)。第一節では、PVA 同士における相互作用の存在、第二節では、PVA と PBA-CyD の CyD 部位間の相互作用の存在、第三節では、PVA と PBA 部位間の相互作用の存在について種々の測定方法を用いて調査し、第四節においてそれらを総合して構造を推定した。

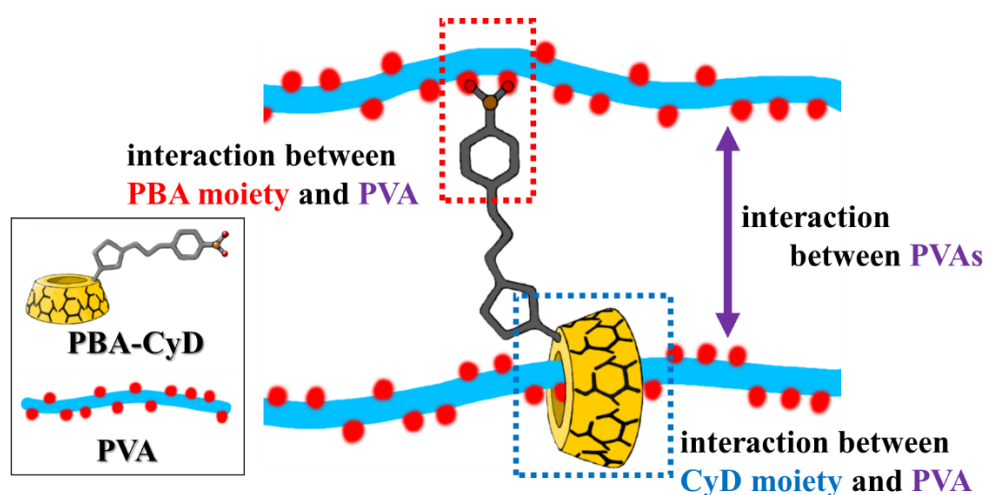


Figure 14. Investigation object in second chapter

## 第一節 PVA 同士間における相互作用

PVA 水溶液は凍結融解を繰り返すことでハイドロゲルを形成するが、これは、PVA 同士間で水素結合が生じて架橋を形成するためである<sup>1,2,35</sup>。つまり PVA は、そのみでハイドロゲルを形成することが可能であり、PBA-CyD/PVAgel であると予想しているハイドロゲルも PVA 同士間の架橋により成立している可能性がある。そこで、PVA と PBA-CyD/PVAgel (凍結乾燥品) に対して示差走査熱量測定 (DSC) を行い、PVA 同士間における相互作用の存在を調査した。DSC はサンプルの温度を上昇させた過程において生じる熱的变化を検出するものである。PVA の結晶やハイドロゲルは、PVA 同士の相互作用によって成立しており、DSC において、融解熱としてこの相互作用の存在を確認できる。

結果を Figure 15 に示す。PVA (重合度 500) と PVA と PBA-CyD の physical mixture (mol 比 PBA-CyD : PVA =15.2 : 0.364) からは 200°C 付近に達したところで PVA の融解に由来すると考えられる吸熱ピークが確認された。よって、これらのサンプル内には PVA 同士における相互作用による結晶構造が存在することが示唆された。一方、PBA-CyD/PVAgel からは PVA の融解熱ピークは確認されなかった。つまり、PBA-CyD/PVAgel には PVA 同士間における相互作用は存在しないか、もしくは極めて小さいことが示唆された。

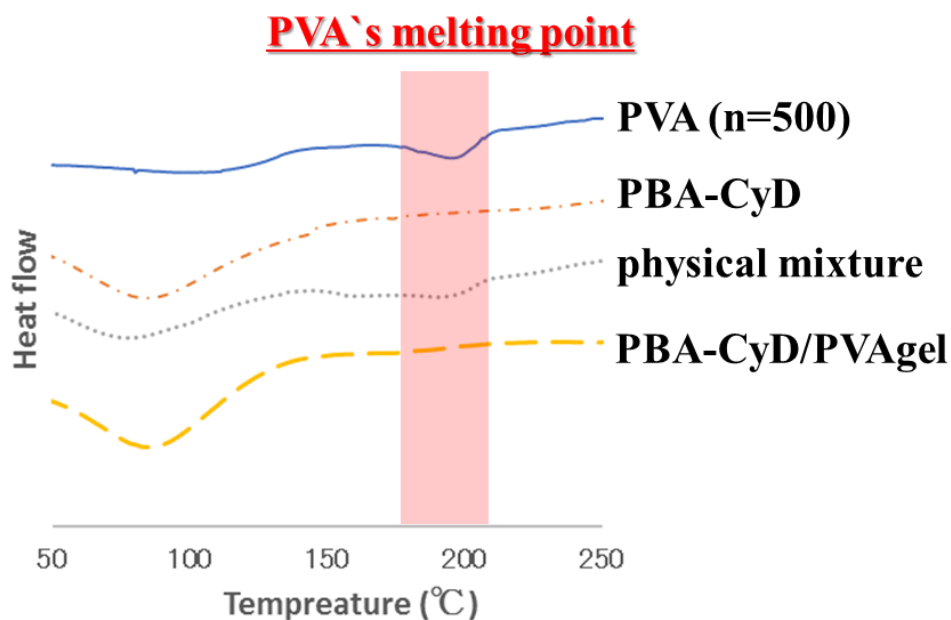


Figure 15. DSC thermograms



## 第二節 CyD 部位と PVA 間における相互作用

$\gamma$ -CyD と PVA の包接複合体の形成は既に報告されている<sup>17)</sup>。しかし、CyD の包接能は官能基の導入により大きく変化する可能性があり、PBA を修飾した CyD である PBA-CyD が PVA を包接する確証は無い。そこで、CyD の包接複合体形成を裏付ける方法として広く知られている固体状態のサンプルを用いた  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル測定を行った<sup>10,17,36,37)</sup>。十分に乾燥した CyD の固体を用いることで、空孔内に溶媒などが無い CyD の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを測定することができる。この状態の CyD の環構造は歪んでおり、CyD を構成している各 D-グルコースが等価ではないことから、Figure 16 のように由来が同じであってもピークが細かく分裂する<sup>9,38)</sup>。そこへ CyD の包接対象が共存した場合、空孔内へ別分子が入り込むことで構造が矯正され、それに伴いピークの分裂も解消する。このピークの分裂解消を目印として包接複合体形成を調査した。

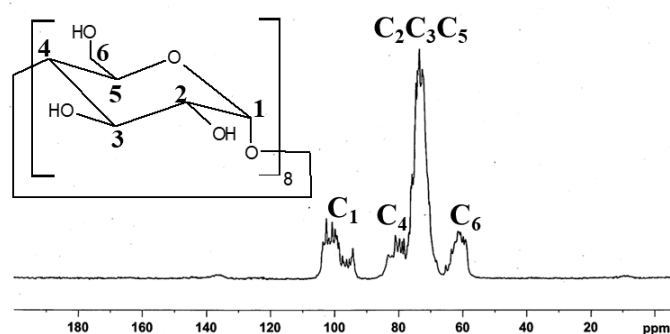


Figure 16.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of solid-state  $\gamma$ -CyD

PBA-CyD/PVAgel と PBA-CyD の測定結果を Figure 17 に示す。PBA-CyD/PVAgel においてピークの分裂解消が観察された (Figure 17A)。よって、PBA-CyD の CyD 部位への PVA 包接の可能性が示された。しかし、PVA が存在しない PBA-CyD のスペクトル上でも、ピークの分裂が解消されていた (Figure 17B)。この事実を別の方法を用いて更に調査することにした。

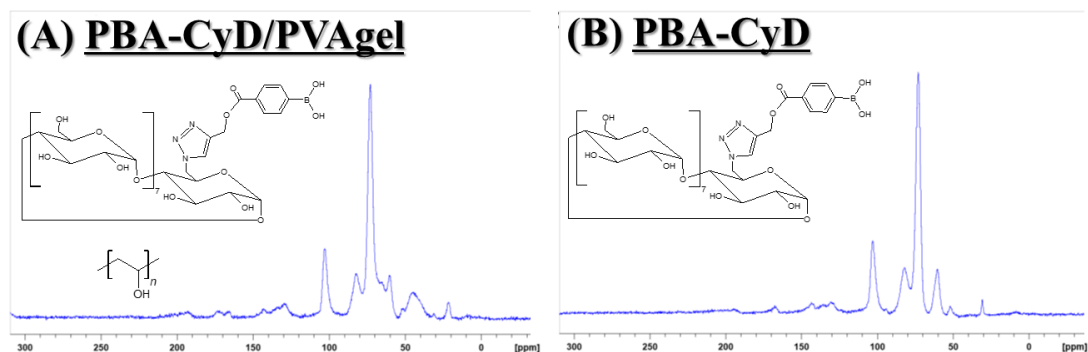


Figure 17.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of solid-state PBA-CyD/PVAgel (left) and PBA-CyD (right)

Figure 18 に溶液状態 (溶媒 : D<sub>2</sub>O) で測定した PBA-CyD の <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY スペクトルを示す。NOESY は、核オーバーハウザー効果 (NOE) と呼ばれる接近した核間 (5 Å 以内) でシグナル強度が変化する現象を検出することで、核間が接近した状態であることを確認する方法である<sup>39,40)</sup>。すなわち、横軸、縦軸に <sup>1</sup>H-NMR スペクトルをプロットし、各ピークに注目して、そこで交差するピークが存在すれば、それらのピークに由来するプロトン同士が接近した状態にあることを示している。NOESY は、包接複合体形成時の CyD とゲスト分子の位置関係を調査する目的で汎用される<sup>41,42,43)</sup>。ここで PBA のフェニル環のプロトンに由来するピークと CyD の空孔内のプロトンに由来するピークに注目すると、それらの間で交差ピークが存在していた。これは、CyD の空孔内とフェニル環が接近した状態にあることを示唆している。よって、分子間もしくは分子内において PBA 部位が CyD 部位に包接されている可能性が示され、Figure 17 の <sup>13</sup>C-NMR スペクトル上に観察されたピークの分裂解消は、PBA 部位が包接されたためであると考えられた。

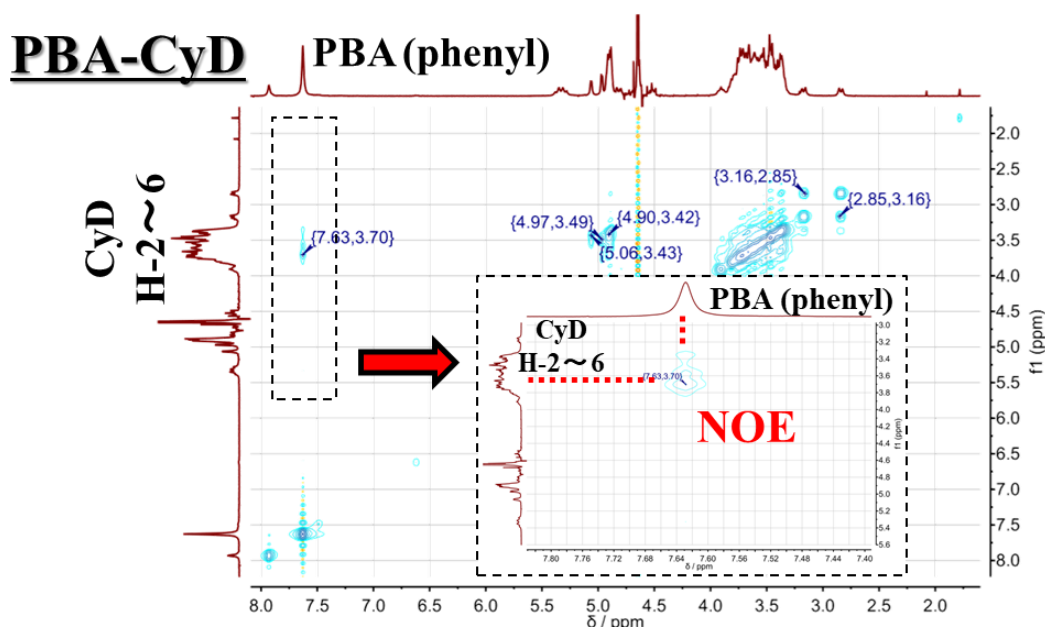
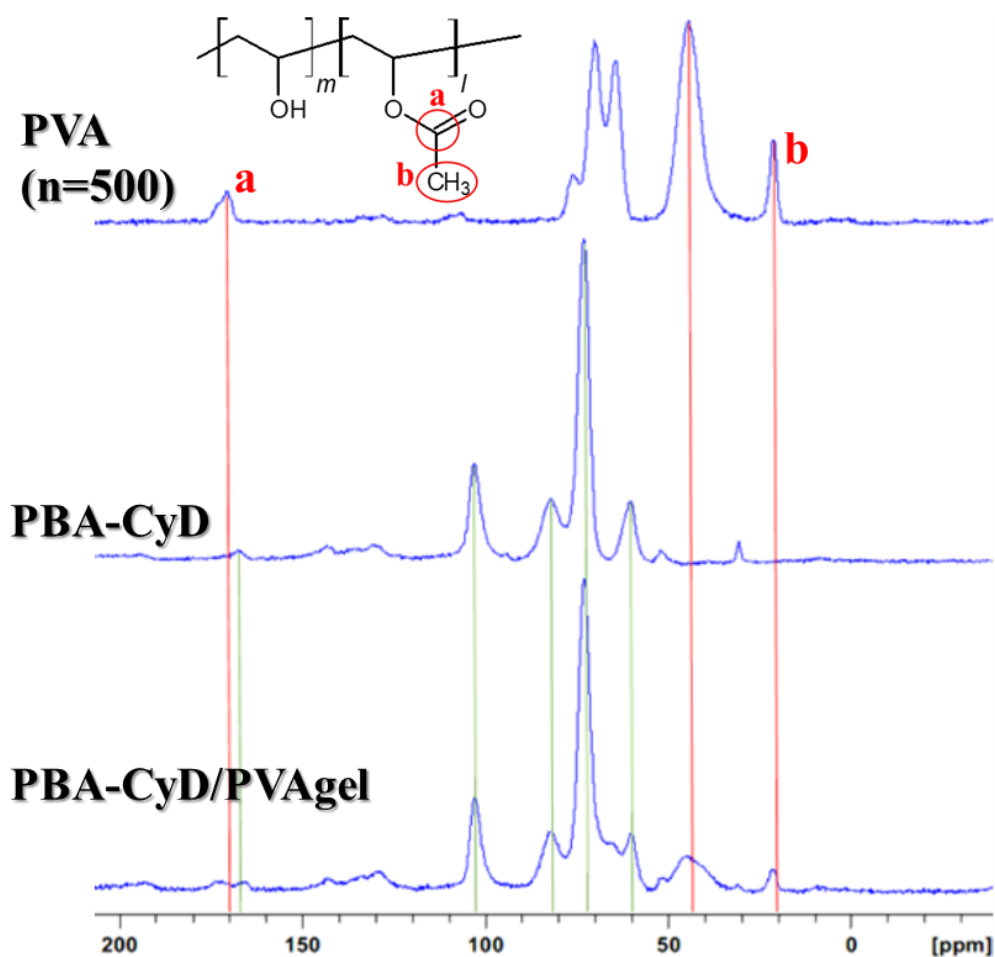
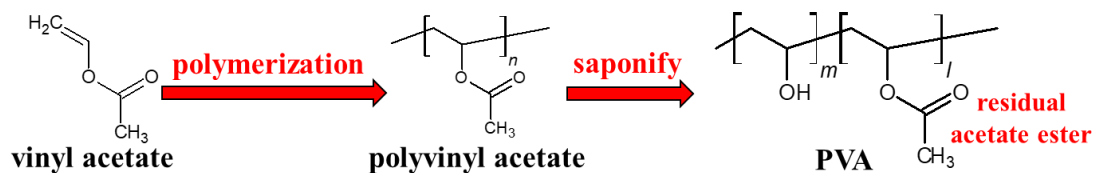


Figure 18. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY spectra of PBA-CyD

<sup>13</sup>C-NMR スペクトルの結果から、PBA-CyD の CyD 部位が包接している部分について考察した。PVA は、酢酸ビニルを重合してポリ酢酸ビニルとした後に、けん化することで工業的に合成される (Scheme 2)<sup>1,2,44)</sup>。このけん化反応は、必ずしも完全には進行せず、いくらか酢酸エステルが残存する場合はほとんどである。よって、市販されている PVA には「けん化度」が設定されており、本研究で用いた PVA のけん化度は 86-90% である。つまり、PVA 全体の 10-14% には酢酸エステルが残存しており、Figure 19 に示す PVA の <sup>13</sup>C-NMR スペクトル上にも酢酸エステル由来のピークが確認できる。PBA-CyD/PVAgel においても確認されたが、PVA 単独のスペクトル上よりも僅かに低磁場へシフトしているのが確認された。これは、PVA と PBA-CyD 間で相互作用が働いているためであり、シスジオー

ル様構造が無い酢酸エステル部分に PBA 部位が相互作用しないとすれば、ピークの低磁場シフトは PVA の酢酸エステル部分が CyD 部位により包接されていることを示唆している。過去の研究報告においても、ポリ酢酸ビニルが $\gamma$ -CyD と包接複合体を形成することが示されている<sup>45,46</sup>。よって、PBA-CyD/PVAgel においては、主に PVA の酢酸ビニル部分が CyD 部位に包接されている可能性が高いことが示された。ただし、この結果は PVA のビニルアルコール部分が包接されていないことを示すものではない。



**Figure 19.**  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of solid-state PVA (upper), PBA-CyD (center) and PBA-CyD/PVAgel (under)

### 第三節 PBA 部位と PVA 間における相互作用

PBA と PVA 間で結合が生じることも既に報告されている<sup>2,3,4,5)</sup>。しかし、CyD 部位の存在が PBA と PVA 間の結合に対して影響することも考えられる。そこで、PBA-CyD/PVAgel においてその結合の存在を確認するため、PBA のシスジオール応答性を利用した濁度試験を行った (Figure 20)。この方法は PVA と PBA 間の結合形成、解離の調査に利用されている<sup>27)</sup>。凍結乾燥した PBA-CyD/PVAgel を粉末状にして水中に懸濁させる。その懸濁液に対し、波長 700 nm における吸光度の値を経時的に測定する。ここで検出されるのは、懸濁粒子により散乱する可視光の尺度「濁度」であり、懸濁粒子の濃度が見かけ上吸光度として測定される。この懸濁液へシスジオール構造を持つポリオール化合物 (カテコール、フルクトース、グルコース) を添加した直後から、その濁度変化を観察する。

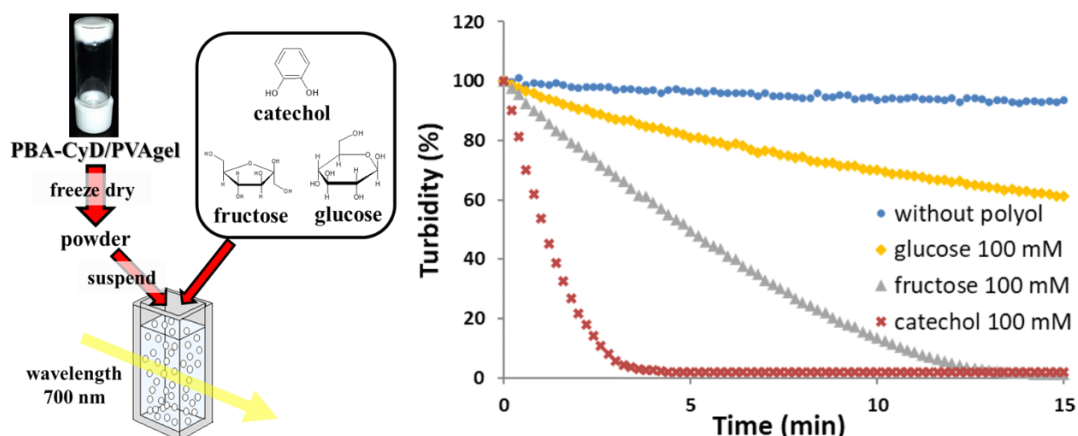


Figure 20. Method and result of turbidity measurement

結果を Figure 20 に示す。ポリオール化合物の添加により、濁度の減少が観察された。この濁度の減少速度は溶解速度にあたるものである。ある確率で懸濁粒子がポリオール化合物と接触して結合したときに一瞬で粒子が溶解すると仮定し、その溶解過程を一次反応論に当てはめて溶解初期における溶解速度定数を算出した。その結果、ポリオール化合物間で溶解速度定数に差がみられ、カテコールで最も大きな値を示した (Table 2)。これは、PBA に対する結合定数  $K_{eq}$  の差に起因すると考えられ、 $K_{eq}$  は次の式 1, 2, 3 で算出される (Figure 21, Table 3)<sup>19)</sup>。

Table 2. Dissolution rate constant of PBA-CyD/PVAgel in the presence of polyols

	dissolution rate constant ( $\text{min}^{-1}$ )
catechol	0.927
fructose	0.128
glucose	0.0446

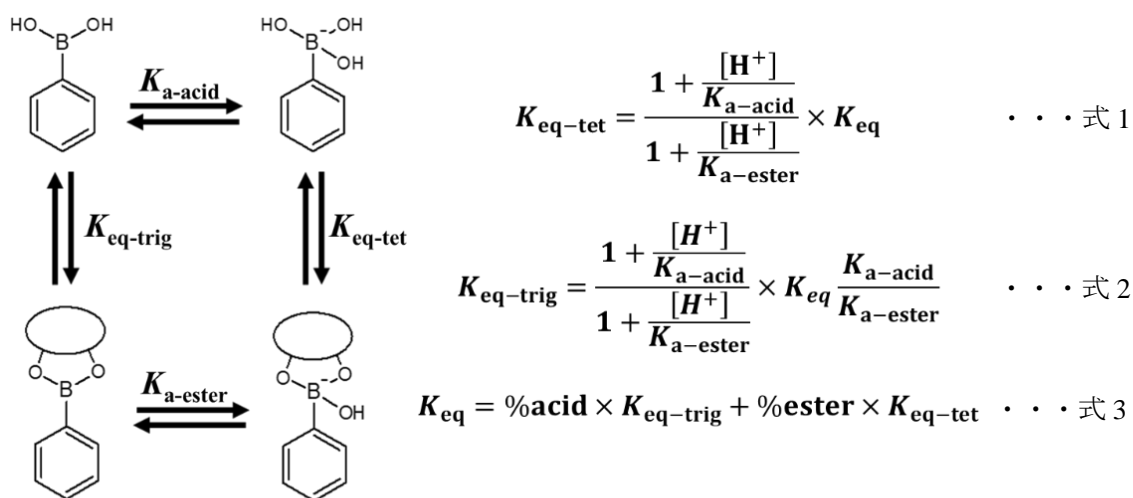


Figure 21. Equilibrium reactions and constants of PBA

Table 3. Binding constant of complexes between PBA and polyols

binding constant $K_{\text{eq}} (\text{M}^{-1})$	
catechol	1300
fructose	160
glucose	4.6

溶解速度定数の大小関係は  $K_{\text{eq}}$  の大小関係と一致した。以上から、この溶解現象は、PVA と PBA 間の結合が添加したポリオール化合物へ置換されたことで PBA-CyD/PVAgel が崩壊したことによると考えられ、PBA-CyD/PVAgel が PBA 部位と PVA 間の結合により成り立っていたことが示唆された。

#### 第四節 相互作用を考慮した PBA-CyD/PVAgel の構造推定

第一節から第三節までで、PBA-CyD/PVAgel 内に存在すると考えられる相互作用について調査を行った (Figure 22)。その結果、①PBA-CyD/PVAgel の形成には PVA 同士間での相互作用はほとんど関与していないこと、②CyD 部位と PVA (主に残存している酢酸エステル部分) 間で包接複合体を形成している可能性が示されたこと、③PBA 部位と PVA 間での結合が示唆されたことから、第一章の Figure 10 のような架橋構造が概ね妥当なものであり、この架橋によってハイドロゲルが形成されていると推定された。

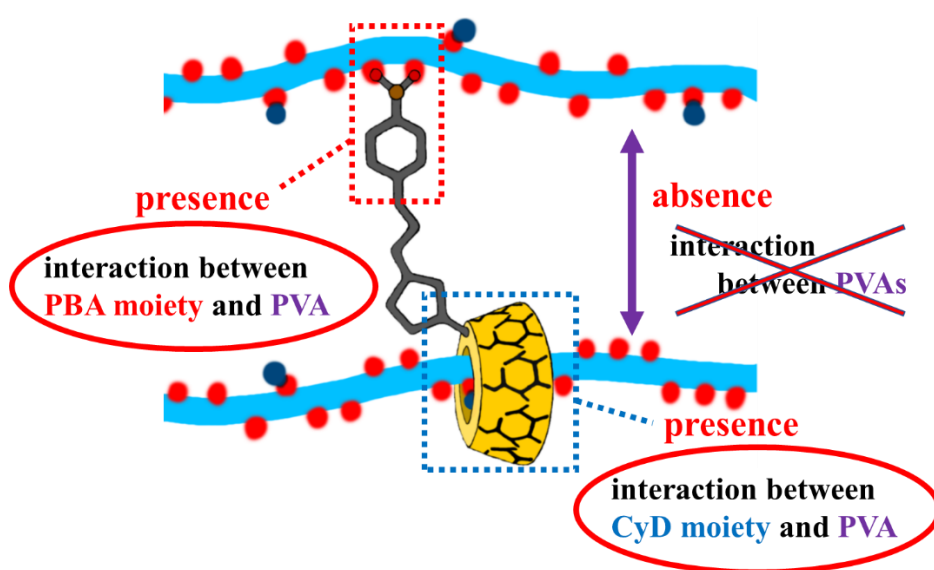


Figure 22. Conclusion of the second chapter

## 小括

第二章においては、第一章で調製した PBA-CyD/PVAgel に対し、その内部に存在し得る相互作用について調査を行い、それを踏まえ PBA-CyD/PVAgel の構造を推定した。その結果、PBA-CyD/PVAgel の形成は PVA 同士間の相互作用によるものではなく、PBA-CyD の CyD 部位と PBA 部位が PVA に対してそれぞれ異なった相互作用を示したことよると示唆された。また、PBA 部位の結合を調査する過程において、PBA-CyD/PVAgel がポリオール化合物の存在に反応して崩壊することが示された。

### 第三章 PBA-CyD/PVAgel の薬物放出制御への利用

第二章において、PBA-CyD/PVAgel が糖類やカテコールといったポリオール化合物の存在に応答して崩壊することを示した。生体内で普遍的に存在し得るそれらの化合物に対し応答を示すことから、PBA-CyD/PVAgel をセンサーや薬物担体として薬学的に応用できる可能性がある。そこで、薬物担体としての可能性を検討するため、PBA-CyD/PVAgel にモデル薬物を封入したときの薬物放出について調査した。PBA-CyD/PVAgel が刺激物質（フルクトース、グルコース、過酸化水素）の存在に応答して崩壊し、薬物放出が促進されると考えられる。



## 第一節 フルクトース、グルコース存在下における

### 薬物放出とゲルの崩壊

シスジオール応答を期待し、フルクトース、グルコースが存在したときの PBA-CyD/PVAgel からの薬物放出について調査した。放出実験を行うにあたって、モデル薬物にはフルオレセインナトリウム (FNa) を用いた (Figure 23)。実験の手順を Figure 24 に示す<sup>12)</sup>。バイアル中で FNa を溶解した PBA-CyD 水溶液と PVA 水溶液を混合し、FNa を封入した PBA-CyD/PVAgel を調製した。ここへフルクトースもしくはグルコース水溶液を加え振盪、経時的に上澄みをサンプリングし、放出された FNa を定量した。

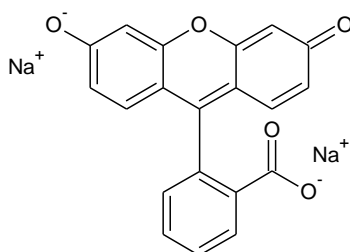


Figure 23. Structure of sodium fluorescein

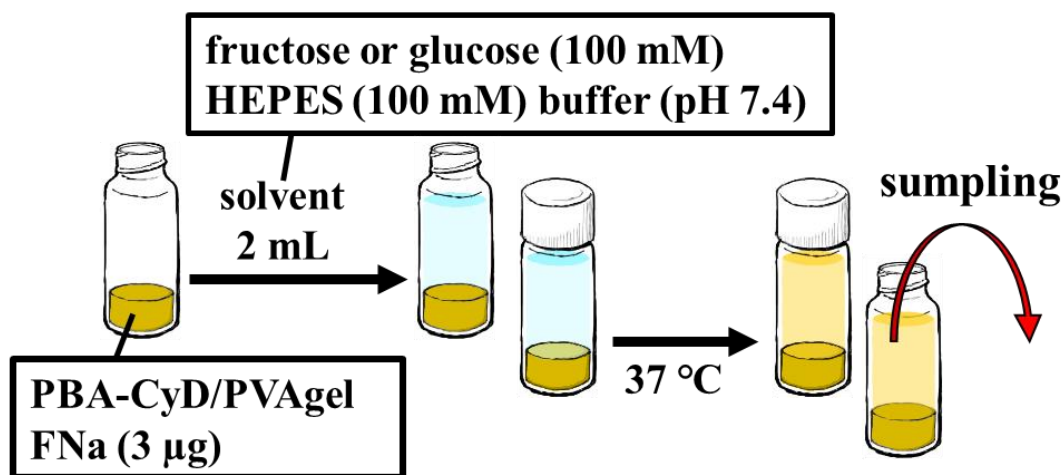
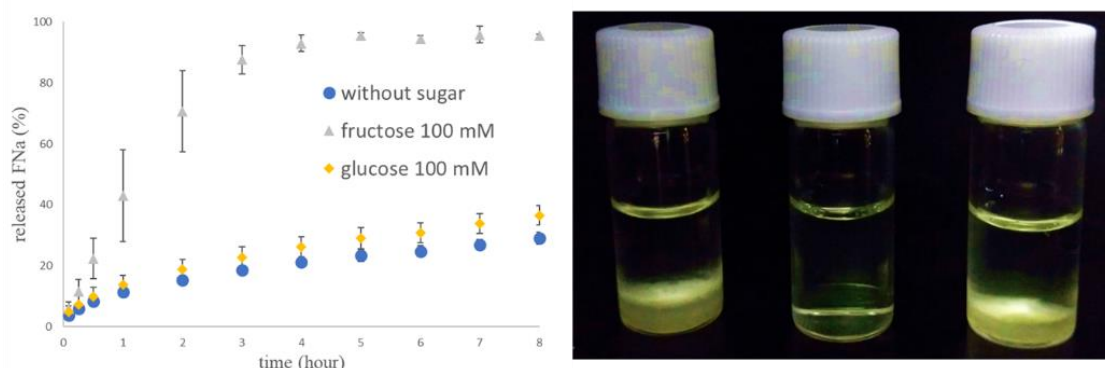


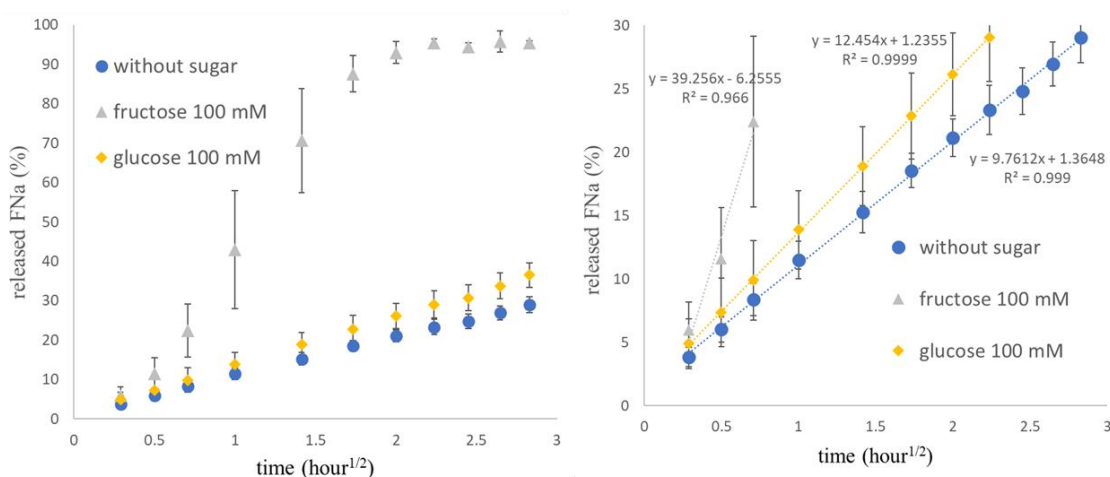
Figure 24. Procedure of release experiments in the presence of sugars

結果と実験後の PBA-CyD/PVAgel 画像を Figure25 に示す。また、横軸に時間の平方根をプロットし、放出率 30%までの値を用いて引いた近似直線の傾きから W.Higuchi 式を用いて PBA-CyD/PVAgel 中の FNa の拡散係数を算出した(Figure 26, Table 4)<sup>47</sup>。Q は単位面積当たりの薬物溶出量、C<sub>0</sub> は初期のゲル中薬物濃度、D はゲル中における薬物の拡散係数、t は時間である。



**Figure 25. Release profiles of FNa from PBA-CyD/PVAgel and effect of sugars (n=3) and picture of PBA-CyD/PVAgel after experiment without sugar (left), with fructose (center), and with glucose (right)**

$$Q = 2C_0\sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \quad \dots \text{W.Higuchi 式}$$



**Figure 26. Converted release profiles of Figure 25 in square root of time**

**Table 4. Diffusion coefficients of FNa in PBA-CyD/PVAgel under sugar aqueous solution**

	diffusion coefficient D (cm <sup>2</sup> /sec × 10 <sup>7</sup> )
without sugar	<b>3.32</b>
fructose 100 mM	<b>53.76</b>
glucose 100 mM	<b>5.41</b>

フルクトース共存下では、非共存下と比較して拡散係数が大幅に上昇し、4時間目までにはほぼ100%の放出率を示した。これは、PBA-CyD/PVAgelの網目構造が初期の段階で大きく変化し、その後、崩壊したことによると考えられた。水中におけるFNaの拡散係数は $190 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{sec}$ と報告されていることから、少なくとも放出実験30分後まではゲルの網目構造は保持されていたことが推察された<sup>48)</sup>。グルコース存在下においては拡散係数がわずかに上昇したが、薬物放出は促進されなかった。これは、PBA部位へのグルコースの結合がほとんど生じず、網目構造はわずかに変化したが、ゲルの崩壊までには至らず、網目構造間におけるFNaの拡散性には変化が生じなかったためと考えられた。このフルクトースとグルコースの差は、濁度試験の結果同様PBAに対する結合の差によるものと考えられた (Table 3)。

## 第二節 過酸化水素応答性を利用した刺激応答性薬物放出

PBA は過酸化水素に対する応答性も有する (Figure 8)<sup>24,26,27</sup>。シスジオール応答性と応答様式は異なるが、PBA のボロン酸部分が解離することによって同様に PBA-CyD/PVAgel が崩壊すると考えられる。本節では過酸化水素に対する応答性を調査するが、更にこの応答性を利用してグルコースに対する応答性を PBA-CyD/PVAgel に持たせる。グルコースは血糖値の指標になる重要な化合物であり、グルコース応答性が得られれば、例えば、血糖値が上昇した場合においてインスリンなどの血糖降下薬を放出するような薬物担体としての利用が期待できる。しかし、前節において PBA-CyD/PVAgel にはグルコースに対する応答性は小さいことが確認された。そこで Scheme 3 に示すグルコースオキシダーゼ (GOx) による酵素反応を利用することにした。GOx は酸素を消費してグルコースからグルコン酸と過酸化水素を生成する<sup>49,50</sup>。つまり、GOx を PBA-CyD/PVAgel と共存させることで間接的にグルコース応答性が得られる (Figure 27)。GOx のような過酸化水素を生成する酸化酵素を用いて PBA に新規の応答性を付与する研究は既に報告されており、本節でも同様の応答を示すと考えた<sup>50,51,52,53</sup>。

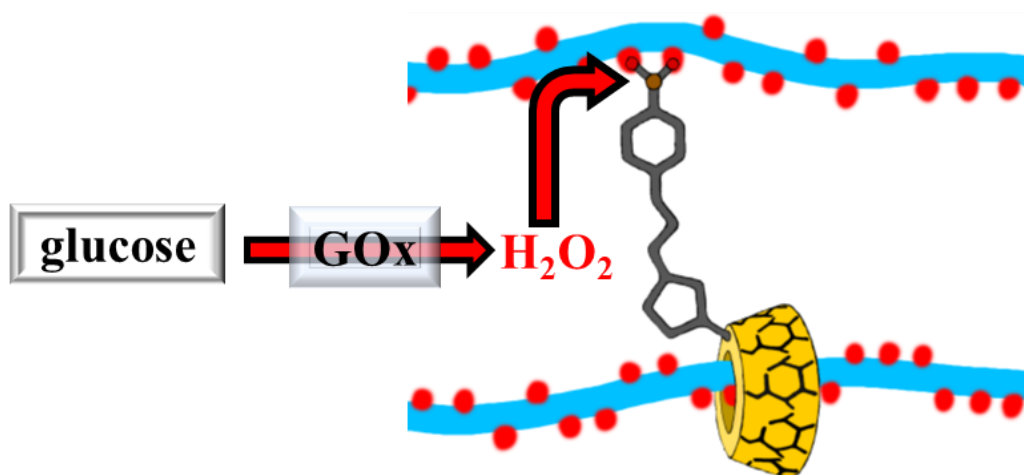
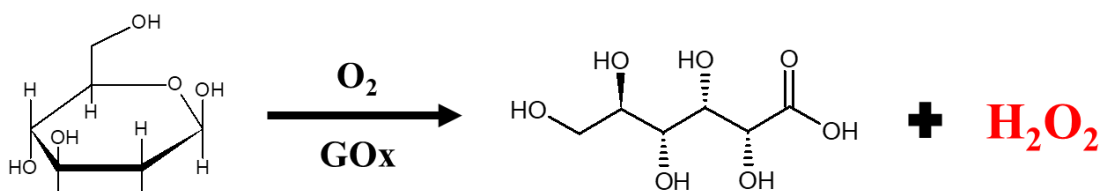


Figure 27. Response of PBA-CyD/PVAgel to glucose by GOx mediation

初めに過酸化水素に対する応答性を FNa 放出実験により調査した。また、GOx によって過酸化水素とともにグルコン酸も生成されることから、グルコン酸に対する応答性も調査した (Figure 28)。グルコン酸も PBA に対して応答を示すポリオール化合物の一つとして報告されている<sup>19)</sup>。

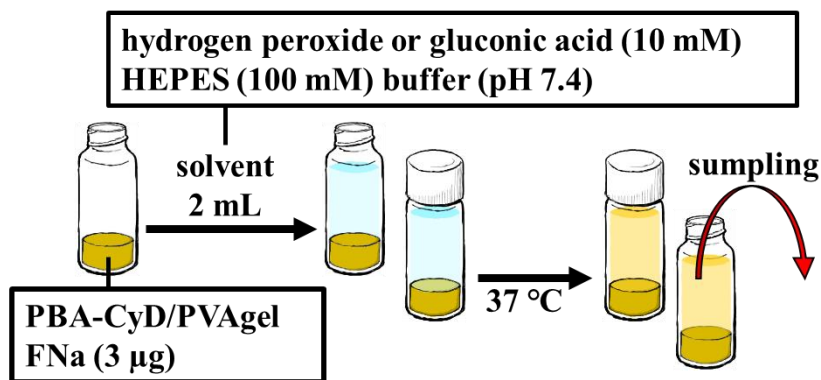


Figure 28. Procedure of release experiments in the presence of hydrogen peroxide or gluconic acid

結果と実験後の PBA-CyD/PVAgel を Figure 29 に示す。過酸化水素、グルコン酸いずれにも応答を示した。しかし、過酸化水素存在下において速やかな FNa 放出が観察されたことと、実験後の PBA-CyD/PVAgel が完全に溶解していたことから、過酸化水素とグルコン酸が混在した場合には過酸化水素による影響のほうが大きいと予想された。

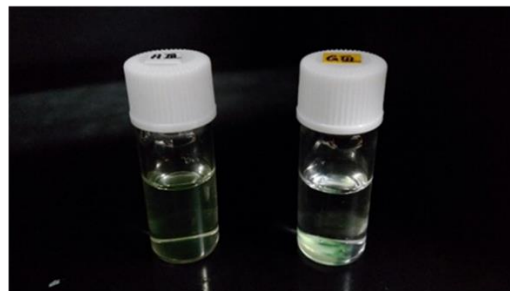
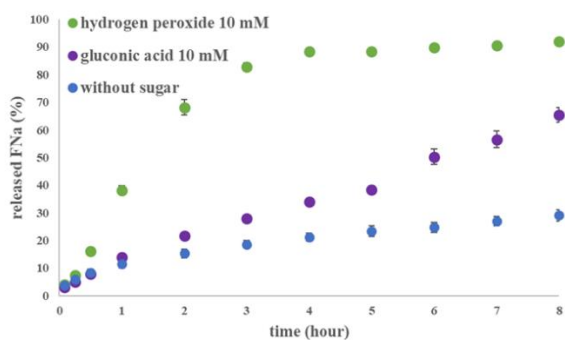
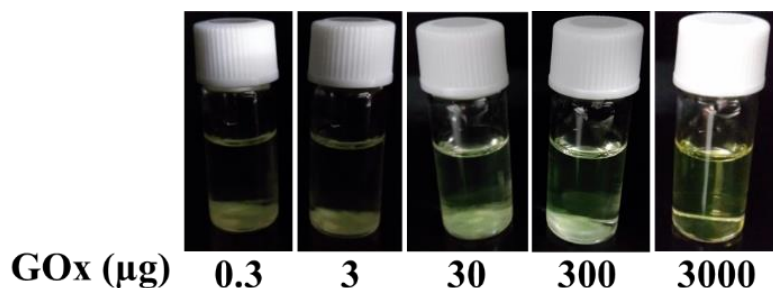


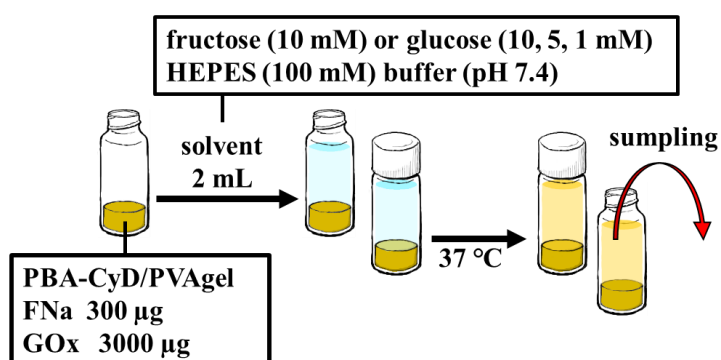
Figure 29. Release profiles of FNa from PBA-CyD/PVAgel and effect of hydrogen peroxide and gluconic acid (n=3), and picture of PBA-CyD/PVAgel after experiment with hydrogen peroxide (left) and gluconic acid (right)

次に GOx を封入した PBA-CyD/PVAgel をグルコース水溶液 (100 mM) に 8 時間浸漬させたときの PBA-CyD/PVAgel の様子から添加する GOx 量を決定した。GOx は調製段階で PBA-CyD 水溶液に溶解させることで封入した。結果、3000  $\mu\text{g}$  封入した場合に PBA-CyD/PVAgel が完全に溶解することが確認された (Figure 30)。以降 GOx は 3000  $\mu\text{g}$  封入することにした。



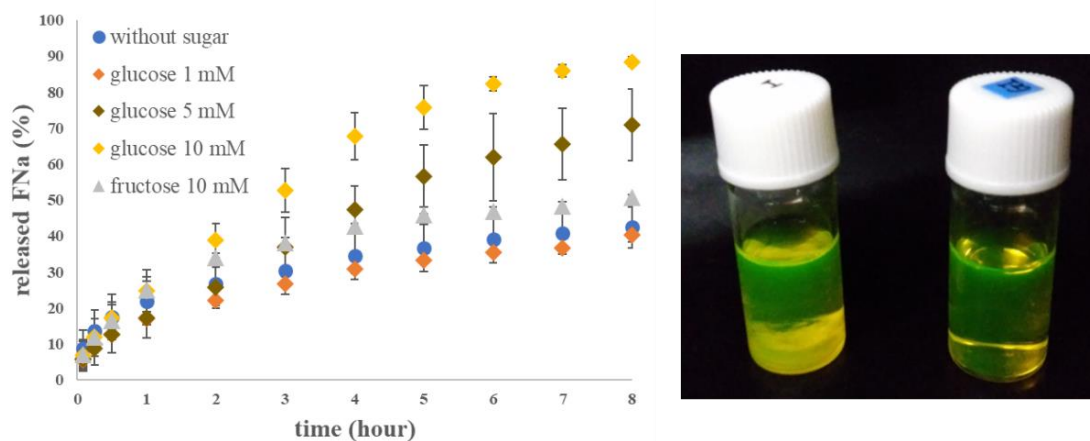
**Figure 30. Pictures of PBA-CyD/PVAgel encapsulating GOx in glucose solution eight hour later**

GOx を封入した PBA-CyD/PVAgel を用いて FNa 放出実験を行った (Figure 31)。実験操作は前節と同様でここでは、フルクトース 10 mM、グルコース 1, 5, 10 mM 存在下における FNa 放出を観察した。



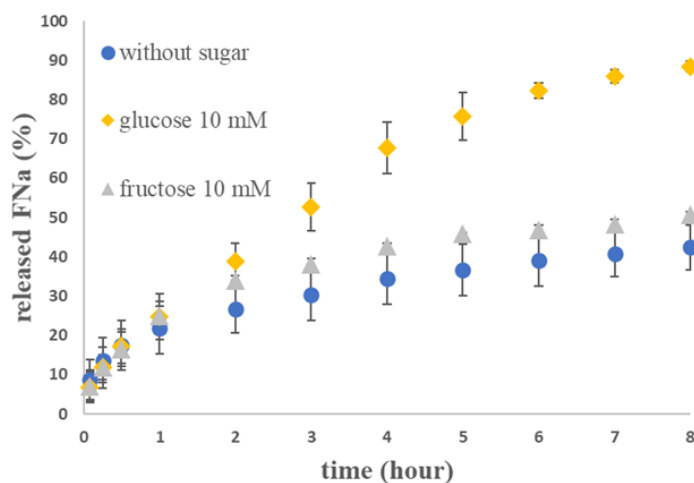
**Figure 31. Procedure of release experiments in the presence of sugars and GOx**

結果と実験後の PBA-CyD/PVAgel の画像を Figure 32 に示す。各糖、各グルコース濃度において特徴的な薬物放出が観察された。また、グルコース 10 mM 条件下でのみ PBA-CyD/PVAgel は完全に溶解した。



**Figure 32. Release profiles of FNa from PBA-CyD/PVAgel encapsulating GOx and effect of sugars (n=3), and picture of PBA-CyD/PVAgel after experiment without sugar (left) and with glucose (10 mM, right)**

Figure 32 から糖別に抜き出したプロファイルを Figure 33 に示す。また、横軸に時間の平方根をプロットし、放出率 30% までの値から引いた近似直線の傾きから W.Higuchi 式を用いて PBA-CyD/PVAgel 中の FNa の拡散係数を算出した (Figure 34, Table 4)。初期の拡散係数は糖間で差がほとんどないことから、同様の網目構造の変化が生じた可能性がある。しかし、グルコース存在下では更にゲルが崩壊までに至り、FNa がすべて放出されたと考えられた。



**Figure 33. Release profiles of FNa from PBA-CyD/PVAgel encapsulating GOx with glucose (10 mM) or fructose (10 mM)**

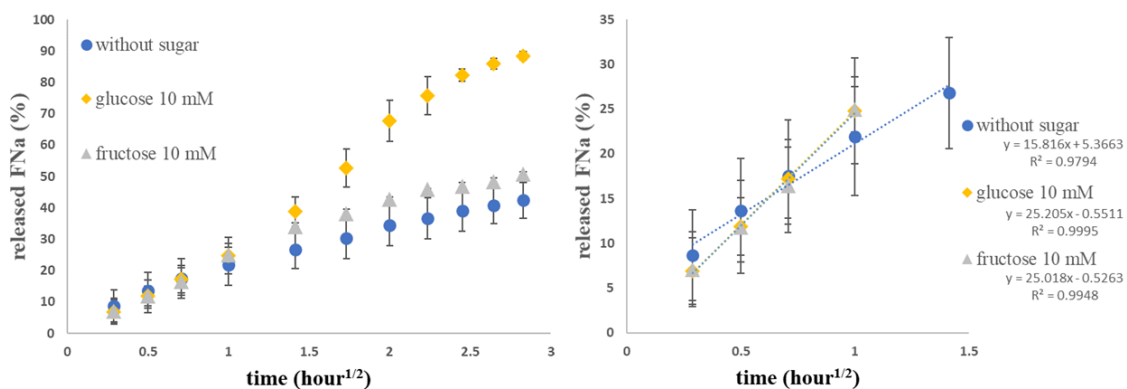


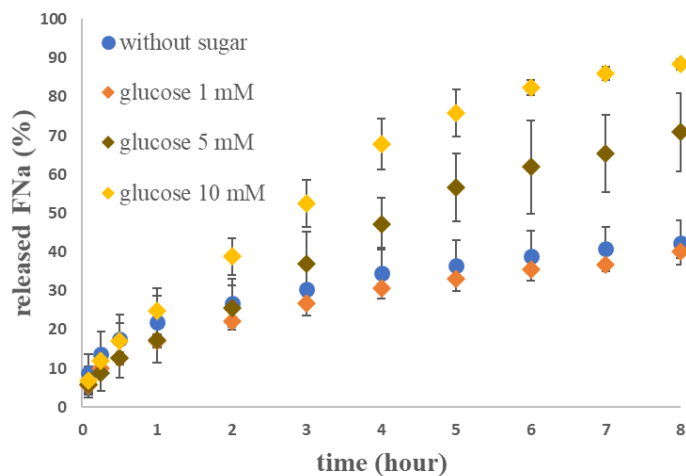
Figure 34. Converted release profiles of Figure 33 in square root of time

Table 5. Diffusion coefficients of FNa in PBA-CyD/PVAgel encapsulating GOx with glucose (10 mM) or fructose (10 mM) aqueous solution

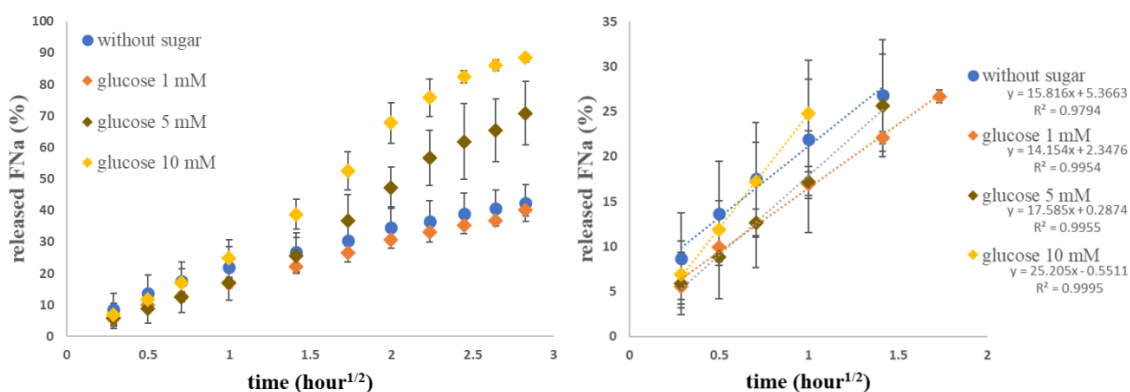
	diffusion coefficient D ( $\text{cm}^2/\text{sec} \times 10^7$ )
without sugar	8.73
glucose 10 mM	22.2
fructose 10 mM	21.8

Figure 35 では、グルコース濃度別に抜き出したものをプロットした。また同様に、横軸に時間の平方根をプロットし、放出率 30%までの値から引いた近似直線の傾きから W.Higuchi 式を用いて PBA-CyD/PVAgel 中の FNa の拡散係数を算出した(Figure 36, Table 5)。グルコース 1 mM では FNa 放出促進は観察されなかった。よって 1 mM では PBA-CyD/PVAgel に対して特に影響は与えないと考えられた。5 mM では、初期の拡散係数がわずかに大きくなっていることから、PBA-CyD/PVAgel の構造変化を示唆している。そして 2 時間目から放出速度が大きくなっていることから、PBA-CyD/PVAgel の崩壊が開始されたと考えられた。





**Figure 35. Release profiles of FNa from PBA-CyD/PVAgel encapsulating GOx with glucose (1, 5, 10 mM)**



**Figure 36. Converted release profiles of Figure 35 in square root of time**

**Table 5. Diffusion coefficient of FNa in PBA-CyD/PVAgel encapsulating GOx with glucose (1, 5, 10 mM) aqueous solution**

diffusion coefficient D ( $\text{cm}^2/\text{sec} \times 10^7$ )	
without sugar	<b>8.73</b>
glucose 10 mM	<b>22.2</b>
glucose 5 mM	<b>10.8</b>
glucose 1 mM	<b>6.99</b>

## 小括

第二章において PBA-CyD/PVAgel がフルクトース、グルコースの存在に応答して崩壊する現象が観察されたことから、この章では PBA-CyD/PVAgel 中にモデル薬物を封入したときの薬物放出について調査した。結果、PBA に対して強い結合能を持つフルクトースが共存した場合において顕著な放出促進が観察された。グルコース共存下においては PBA に対する結合能が弱いためか、放出促進は観察されなかったが、GOx によるグルコースからの過酸化水素生成反応と PBA のもつ過酸化水素応答性を併用したことで、同濃度のフルクトースよりもグルコース共存下で顕著な放出促進を得ることが可能であった。これは、5～10 mM という範囲で生じた。PBA-CyD/PVAgel からの薬物放出は、形成されたゲル構造に依存すると考えられ、例えば PVA の分子量や添加量、PBA-CyD の添加量である程度修飾可能であると考えられる。本章ではモデル薬物に低分子化合物である FNa を用いたが、ペプチドのような高分子量の薬物を封入する場合に本研究のハイドロゲルが適当であるとは限らない。その場合は PVA と PBA-CyD の混合比といったゲル調製の処方を調節することによって適当な薬物放出を得られる可能性がある。

## 総括

本研究では、PBAを導入した $\gamma$ -CyDであるPBA-CyDを新規に合成し、PVAと水中で混合することで水ゲルPBA-CyD/PVAgelを調製した。ゲルが形成されたことからPVA同士がPBA-CyDによって架橋されたと考えられ、その架橋構造は一方がCyD部位とPVA間における包接複合体、もう一方はPBAとPVA間の化学結合によって成立していると推定された。推定された架橋構造は、種々の測定方法により裏付けされ、概ね妥当なものであることが確認された。PBA-CyD/PVAgelは、糖類、カテコールといったポリオール化合物の存在に対して崩壊するという特性があり、これを利用したポリオール応答性薬物放出がFNaを封入した放出実験により確認された。また、PBAのもつ過酸化水素応答性を応用した過酸化水素応答性薬物放出も確認された。グルコースのようなPBAに対して結合が弱いポリオール化合物については、顕著な放出促進は得られないが、グルコースについては酸化酵素であるGOxをPBA-CyD/PVAgelに封入することにより間接的に高い応答性が得られた。この反応は酵素反応を利用していることから、高い選択性も持ち合わせており、実際同濃度のフルクトースより放出が促進された。また、理論上過酸化水素を生成するような酸化酵素であれば同様な応答が得られると考えられ、その基質であれば選択的で高い応答性をPBA-CyD/PVAgelに付与できる。よって、PBA-CyD/PVAgelは様々な化合物に対し特異的に応答して薬物を放出する基材になり得ることが示され、新たな刺激応答性の薬物担体やその他機能性材料としての利用が期待できる。

## 謝辞

本論文の作成に当たり、ご助力頂いた各方々の教員方、または学生方に感謝の意をここに表します。

城西大学薬学研究科薬品物理化学講座教授 関 俊暢 先生におかれましては、主研究指導員として本論文の作成に当たっての根本的なご指導をしていただきました。本論文に限らず浅学菲才の私が十分な形で研究成果を発表できたのは研究内容への的確な指摘や表現のご指導によるものであります。

城西大学薬学研究科病院薬剤学講座 上田 秀雄 先生並びに城西大学薬学研究科食毒性学講座教授 和田 政裕 先生におかれましては、本論文の副研究指導員として多数の貴重な助言をいただきました。

城西大学薬学研究科薬品物理化学講座准教授 江川 祐哉 先生におかれましては、本論文の研究内容に関する実験の直接的な部分に関しましてご指導をしていただきました。この研究テーマを与えてくださったことで、本論文の取っ掛かりを作ってくださいました。

城西大学薬学部薬学科薬品物理化学講座助手 三木 涼太郎 先生におかれましては、研究内容について多くの助言をしていただきました。また、本論文の研究をここまで進められたのは、研究環境を快適にくださった所為であります。

埼玉大学大学院理工学研究科物質科学部門物質機能領域准教授 石丸 雄大 先生並びに埼玉大学科学分析支援センター准教授 藤原 隆司 先生におかれましては、<sup>13</sup>CCP/MAS NMR 測定に関しましてご協力いただき、本論文の重要な位置を占める貴重なデータを得ることができました。

城西大学薬学研究科及び薬学部薬品物理化学講座の方々におかれましては、研究の進行に関して助力いただき、貴重な研究データもいただきました。

最後に本論文完成まで研究を続けてこれたのは、何よりも帰宅したときに私の学生生活において唯一の安らぎの場がそこにあったことであります。その場を提供してくれた家族に対して、多大な感謝の意を表します。

## 実験の部

### <試薬>

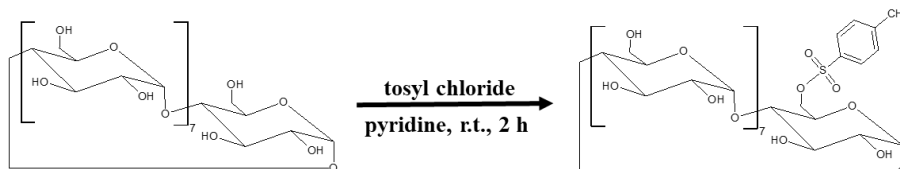
$\gamma$ -Cyclodextrin >98% 特級 純正化学  
*p*-Toluenesulfonyl chloride >99% 東京化成1級 東京化成工業  
Pyridine anhydrous >99.8% SIGMA-ALDRICH  
Sodium azide 98.0% 試薬特級 和光純薬工業  
4-Carboxyphenylboronic acid SIGMA-ALDRICH  
2-Propyn-1-ol 98% 東京化成1級 東京化成工業  
EDC (1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride)  
>98% 特殊用 東京化成工業  
Copper (II) sulfate pentahydrate 99.5% 試薬特級 和光純薬工業  
Sodium L-ascorbate >98% 東京化成特級 東京化成工業  
TBTA (Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl] amine) >97% 東京化成工業  
Polyvinyl alcohol (Polymerization Degree about 500) けん化度 86.0~90.0% 和光純薬工業  
HEPES (*N*-(2-Hydroxyethyl) piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid))  
>99.5% SIGMA-ALDRICH  
D-(+)-Glucose 98.0% 試薬特級 和光純薬工業  
D-(-)-Fructose 99.0% 試薬特級 和光純薬工業  
Pyrocatechol 99.0% 試薬特級 和光純薬工業  
Uranine (Sodium fluorescein) 試薬特級 和光純薬工業  
Hydrogen peroxide (30%) 質量分率 30.0~35.5% 試薬特級 和光純薬工業  
Sodium gluconate >99.0% 東京化成1級 東京化成工業  
Glucose oxidase from *Aspergillus niger* Protein,  $\geq 65\%$  SIGMA-ALDRICH  
※試薬は精製せずに用いた。

### <測定機器>

$^1\text{H-NMR}$ ,  $^1\text{H-}^1\text{H NOESY}$  スペクトル測定 : Varian 400-MR  
(Agilent Technologies, California, USA)  
示差走査熱量測定 : Thermo Plus2 series (Rigaku Corporation, Tokyo, Japan)  
 $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトル測定 : Bruker AVANCE500T (Bruker BioSpin K.K., Kanagawa, Japan)  
濁度試験 : V-530 UV-Vis spectrometer (JASCO Corporation, Tokyo, Japan)  
FNa 定量 : Spectra Max M5e multiplate reader (Molecular Devices Japan, Tokyo, Japan)

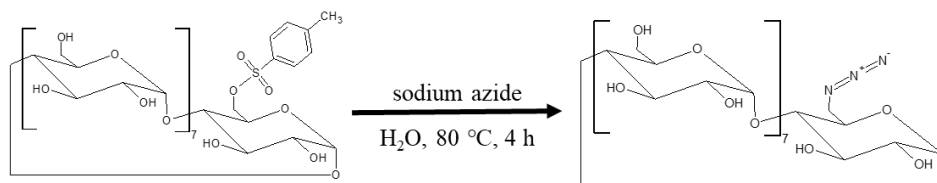
## 第一章

### Tosyl $\gamma$ -CyD の合成



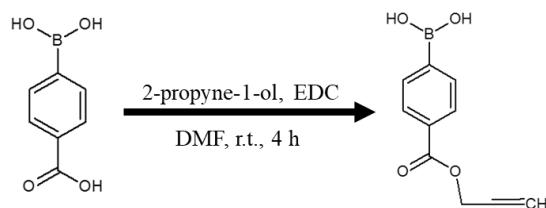
温度 90°C で 2 時間減圧乾燥した  $\gamma$ -CyD (13.0 g, 10.0 mmol) をピリジン (400 mL) に溶解し、氷冷した。tosyl chloride (5.00 g, 26.0 mmol) をピリジン (100 mL) に溶解し、 $\gamma$ -CyD 溶液へゆっくり滴下し、氷冷を止め、1 時間反応させた。蒸留水 (50.0 mL) を加えて反応を止め、反応溶液を濃縮し、アセトン (1.00 L) へ滴下した。析出した固体を濾取し、アセトンで洗浄して回収し、3 時間減圧乾燥した。回収した固体を蒸留水で溶解し、スチレン-ジビニルベンゼン系樹脂 (Diaion HP-20) にサンプルを吸着させて、メタノール/水 (4/1) 混合液によって目的物質を脱吸着させて回収した。収率 30.4%。<sup>1</sup>H-NMR スペクトル測定、FAB-MS (マトリックス: グリセロール) によって構造確認を行った。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.75 (d, 2H, phenyl group),  $\delta$  7.43 (d, 2H, phenyl group),  $\delta$  5.79 (m, 16H, CyD OH-2, OH-3),  $\delta$  4.87 (m, 8H, CyD H-1),  $\delta$  4.53 (m, 7H, CyD OH-6),  $\delta$  3.76–3.35 (m, 32H, CyD H-3, H-5, H-6),  $\delta$  3.35–3.19 (m, 16H, CyD H-2, H-4),  $\delta$  2.40 (s, 3H, toluene CH<sub>3</sub>), MS (FAB, positive mode, matrix: glycerol) m/z: 1451.5 (expected m/z of [M+H]<sup>+</sup>: 1451.5).

### Azide $\gamma$ -CyD の合成



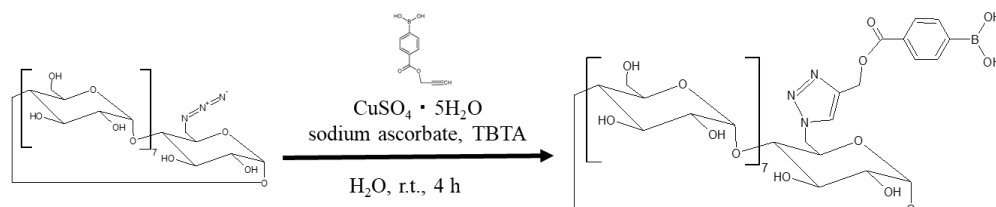
Tosyl  $\gamma$ -CyD (4.00 g, 2.76 mmol) と sodium azide (1.96 g, 30.2 mmol) を蒸留水 (60.0 mL) に懸濁させ、80°C 下で 3 時間反応させた。反応溶液を室温に戻し、アセトン (1.00 L) へ滴下して固体を析出させた。固体を濾取して回収し、アセトンで洗浄して 3 時間減圧乾燥した。Diaion HP-20 にサンプルを吸着させて、メタノール/水 (1/1) 混合液によって目的物質を脱吸着させて回収した。収率 81.2%。<sup>1</sup>H-NMR スペクトル測定により構造を決定した。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  5.77 (m, 16H, CyD OH-2, OH-3),  $\delta$  4.87 (m, 8H, CyD H-1),  $\delta$  4.53 (m, 7H, CyD OH-6),  $\delta$  3.74–3.45 (m, 32H, CyD H-3, H-5, H-6),  $\delta$  3.40–3.22 (m, 16H, CyD H-2, H-4).

## Propyne PBA の合成



4-carboxyphenylboronic acid (1.66 g, 10.0 mmol)、2-propyne-1-ol (5.82 mL, 100 mmol)、triethylamine (2.80 mL, 20.0 mmol)、EDC · HCl (3.83 g, 20.0 mmol) を DMF (40 mL) に溶解し、N<sub>2</sub> ガス下、室温で 5 時間反応させた。反応後、溶媒を減圧留去し、sodium hydrogen carbonate 飽和水溶液 (80.0 mL) を加え ethyl acetate (80.0 mL) で 3 回抽出し、sodium chloride 飽和水溶液で脱水して magnesium sulfate を加えて脱水した。その後、溶媒を留去し、シリカゲルを固定相、クロロホルム/メタノール/酢酸 (100/5/1) 混合液を移動相とした液体クロマトグラフィーにて精製した。収率 35.1%。<sup>1</sup>H-NMR スペクトル測定、FAB-MS によって構造確認を行った。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ 8.31 (s, 2H, BOH), δ 7.91 (m, 4H, phenyl group), δ 4.94 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>C≡), δ 3.61 (s, 1H, C≡CH), MS (FAB, positive mode, matrix: glycerol) m/z: 261 (expected m/z of [M+H+glycerol-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>: 261)。目的物質はグリセロールとの環状エステルとして検出された。

## PBA-CyD の合成



Azide  $\gamma$ -CyD (2.00 g, 1.51 mmol)、propyne PBA (0.309 g, 1.51 mmol)、copper (II) sulfate pentahydrate (18.9 mg, 75.6  $\mu$ mol)、sodium L-ascorbate (59.9 mg, 0.303 mmol)、TBTA (40.1 mg, 75.6  $\mu$ mol) を DMF/水(1/1)混合溶液 (50 mL) に溶解させ、N<sub>2</sub> ガス下、室温で 6 時間反応させた。反応溶液を濃縮し、アセトン (1.00 L) へ滴下して固体を析出させ、濾取してアセトンで洗浄し、3 時間減圧乾燥した。その固体を蒸留水に溶解し、ホウ素選択性陰イオン交換樹脂 (Amberlite IRA743) に吸着させ、酢酸水溶液 (20%) によってサンプルを脱吸着させた。さらに Diaion HP-20 にサンプルを吸着させて、メタノール/水 (1/1) 混合液によって目的物質を脱吸着させて回収した。収率 68.3%。<sup>1</sup>H-NMR スペクトル測定、FAB-MS、元素分析によって構造確認を行った。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ 8.28 (m, 2H, phenyl group), δ 8.18 (s, 1H, triazole), δ 7.89 (m, 2H, phenyl group), δ 5.82 (m, 16H, CyD OH-2, OH-3), δ 4.87 (m, 8H,

CyD H-1),  $\delta$  4.53 (m, 7H, CyD OH-6),  $\delta$  3.76–3.47 (m, 32H, CyD H-3, H-5, H-6),  $\delta$  3.45–3.11 (m, 16H, CyD H-2, H-4), MS (FAB, positive mode, matrix: glycerol) m/z: 1582.6 (expected m/z of [M+H+glycerol-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>: 1582.5). 目的物質はグリセロールとの環状エステルとして検出された。元素分析, calculated for C<sub>58</sub>H<sub>102</sub>N<sub>3</sub>BO<sub>50</sub>[BA-CyD·7H<sub>2</sub>O]: C 42.16, H 6.22, N 2.54%, found: C 42.18, H 5.97, N 2.41%.

### **PBA-CyD/PVAgel の調製**

PBA-CyD 水溶液 (50.7 mM, 300  $\mu$ L) と PVA (重合度 500) 水溶液 (3.64 mM, 100  $\mu$ L) を混合し、20°C下で 14 時間静置した。

## **第二章**

### **示差走査熱量測定**

サンプル (約 1.5 mg) をアルミパンに封入し、昇温速度 10 K/min で行った。PBA-CyD/PVAgel は凍結乾燥し、乳鉢乳棒にて粉末にしたものをサンプルとした。

### **<sup>13</sup>C-NMR スペクトル測定**

固体状態のサンプルでの <sup>13</sup>C-NMR スペクトル測定は <sup>13</sup>C CP (交差分極) /MAS (マジック角回転) NMR (125.7 MHz) により測定した。化学シフトのリファレンスにはグリシンのカルボニル炭素を用いた。

### **<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY スペクトル測定**

重溶媒には D<sub>2</sub>O を用いて PBA-CyD 溶液 (8.19 mM) を調製、混合時間 200 ms で測定した。

### **濁度試験**

凍結乾燥した PBA-CyD/PVAgel (10 mg) を HEPES 緩衝液 (pH 7.4, 2 mL) 中に懸濁させ、そこへポリオール化合物 (catechol, fructose or glucose) 水溶液を添加して懸濁液中ポリオール濃度を 100 mM としたときの可視光 (700 nm) における吸光度を濁度として経時的に測定した。



## 第三章

### **PBA-CyD/PVAgel からの FNa 放出実験**

FNa を含む PBA-CyD 水溶液 (FNa 濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を用いて、第一章と同様の条件、混合量で PBA-CyD/PVAgel (FNa 含有量 3  $\mu\text{g}$ ) をバイアル内に調製した。そこへ、各化合物 (fructose 100 mM, glucose 100 mM, hydrogen peroxide 10 mM, sodium gluconate 10 mM) を含む HEPES 緩衝液 (pH 7.4, 2.00 mL) を加え、放出実験を開始した。経時的に上澄みをサンプリングし、分光蛍光光度法 ( $\lambda_{\text{ex}} = 493$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 519$ ) を用いてサンプル中の FNa 濃度を測定した。

### **GOx を含んだ PBA-CyD/PVAgel からの FNa 放出実験**

FNa と GOx を含む PBA-CyD 水溶液 (FNa 濃度 1.00 mg/mL, GOx 濃度 10.0 mg/mL) を用いて、第一章と同様の条件、混合量で PBA-CyD/PVAgel (FNa 含有量 300  $\mu\text{g}$ , GOx 含有量 3.00 mg) をバイアル内に調製した。そこへ、糖 (fructose 10 mM, glucose 1,5,10 mM) を含む HEPES 緩衝液 (pH 7.4, 2.00 mL) を加え、放出実験を開始した。経時的に上澄みをサンプリングし、分光蛍光光度法 ( $\lambda_{\text{ex}} = 493$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 519$ ) を用いてサンプル中の FNa 濃度を測定した。

## 参考文献

- 1) 高分子学会編, 宮田 隆志 著, 「高分子基礎科学 One Point6 高分子ゲル」, 共立出版(東京), 2017
- 2) 大澤 善次郎 著, 「入門高分子化学」, 裳華房(東京), 1996
- 3) M・L・ベンダー, M・コミヤマ 著, 平井 英史, 小宮山 真 訳, 「シクロデキストリンの化学」, 学会出版センター(東京), 1979
- 4) シクロデキストリン学会 編, 「ナノマテリアル・シクロデキストリン」, 米田出版(千葉), 2005
- 5) J. Szejtli, *J. Mater. Chem.*, 7(4), 575–587, 1997
- 6) F. Manakker, T. Vermonden, C. F. Nostrum, W. E. Hennink, *Biomacromolecules*, Vol. 10, No. 12, 3157-3175, 2009
- 7) G. Wenz, B. Han, A. Muller, *Chem.Rev.* 106, 782–817, 2006
- 8) A. Harada, J. Li, M. Kamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 3192-3196, 1994
- 9) H. Okumura, Y. Kawaguchi, A. Harada, *Macromolecules*, 34, 6338-6343, 2001
- 10) A. Harada, *Coord. Chem. Rev.*, 148, 115-133, 1996
- 11) T. Seki, K. Abe, K. Nakamura, Y. Egawa, R. Miki, K. Juni, T. Seki, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 82, 417–424, 2015
- 12) T. Higashi, A. Tajima, N. Ohshita, T. Hirotsu, I. Ibrahim A. Hashim, K. Motoyama, S. Koyama, R. Iibuchi, S. Mieda, K. Handa, T. Kimoto, H. Arima, *AAPS PharmSciTech*, Vol. 16, No. 6, 1290-1298, 2015
- 13) K. Kato, K. Inoue, M. Kidowaki, K. Ito, *Macromolecules*, 42, 7129–7136, 2009
- 14) T. Cai, W. J. Yang, Z. Zhang, X. Zhu, K. Neohac, E. Kang, *Soft Matter*, 8, 5612-5620, 2012
- 15) C. Zhao, Y. Domon, Y. O., S. Okabe, M. Shibayama, K. Ito, *J. Phys. Condens. Matter*, 17, 2841–2846, 2005
- 16) G. Chen, M. Jiang, *Chem. Soc. Rev.*, 40, 2254–2266, 2011
- 17) R. Hernandez, M. Rusa, C. C. Rusa, D. Lopez, C. Mijangos, A. E. Tonelli, *Macromolecules*, 37, 9620-9625, 2004
- 18) L. I. Bosch, T. M. Fyles, T. D. James, *Tetrahedron*, 60, 11175–11190, 2004
- 19) G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron*, 58, 5291-5300, 2002
- 20) V. V. Karnati, X. Gao, S. Gao, W. Yang, W. Ni, S. Sankar, B. Wang, *Bio. Med. Chem. Lett.*, 12, 3373–3377, 2002
- 21) C. J. Ward, P. Patel, T. D. James, *J. Chem. Soc., Perkin Trans*, 1, 462-470, 2002
- 22) G. A. Ellis, M. J. Palte, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 3631-3634, 2012
- 23) S. Arimori, L. I. Bosch, C. J. Ward, T. D. James, *Tetrahedron Letters*, 43, 911-913, 2002

- 24) X. Sun, S. Xu, S. E. Flower, J. S. Fossey, X. Qian, T. D. James, *Chem. Commun.*, 49, 8311-8313, 2013
- 25) X. Zhang, L. Zhang, Y. Liu, B. Bao, Y. Zang, J. Li, W. Lu, *Tetrahedron*, 71, 4842-4845, 2015
- 26) K. Sato, S. Shimizu, K. Awaji, O. Hitomi, J. Anzai, *J. Coll. Interf. Sci.*, 510, 302-307, 2018
- 27) K. Sato, M. Iwasaki, Y. Oide, J. Anzai, *Colloid Polym Sci*, 295, 1521-1525, 2017
- 28) M. Seno, K. Yoshida, K. Sato, J. Anzai, *Materials Science and Engineering C*, 62, 474-479, 2016
- 29) K. Suwa, M. Nagasaka, S. Niina, Y. Egawa, T. Seki, J. Anzai, *Colloid. Polym. Sci.*, 293, 1043-1048, 2015
- 30) S. Manju, M. Antony, K. Sreenivasan, *J. Mater. Sci.*, 45, 4006-4012, 2010
- 31) B. L. Wilkinson, L. F. Bornaghi, T. A. Houston, A. Innocenti, C. T. Supuran, S. Poulsen, *J. Med. Chem.*, 49, 6539-6548, 2006
- 32) H. Yamamura, Y. Sugiyama, K. Murata, T. Yokoi, R. Kurata, A. Miyagawa, K. Sakamoto, K. Komagoe, T. Inoue, T. Katsu, *Chem. Commun.*, 50, 5444-5446, 2014
- 33) P. S. Donnelly, S. D. Zanatta, S. C. Zammit, J. M. White, S. J. Williams, *Chem. Commun.*, 2459-2461, 2008
- 34) H. Schneider, F. Hacket, V. Rudiger, H. Ikeda, *Chem. Rev.*, 98, 1755-1785, 1998
- 35) C. M. Hasean, N. A. Peppas, *Advances in Polymer Science*, 153, 37-65, 2000
- 36) A. Harada, J. Li, M. Kamachi, *Macromolecules*, 26, 5698-5703, 1993
- 37) J. Li, D. Yan, X. Jiang, Q. Chen, *Polymer*, 43, 2625-2629, 2002
- 38) A. Harada, Y. Kawaguchi, T. Nishiyama, M. Kamachi, *Macromol. Rapid Commun.*, 18, 535-539, 1997
- 39) 日本分析化学学会編, 田代充・加藤敏代著, 「分析化学実技シリーズ機器分析編・*3NMR*」, 共立出版(東京), 2009
- 40) 通和夫・竹内敬人・吉川研一著, 「*実用NMR-CW・FTNMRの使い方*」, 講談社サイエンティフィック(東京), 1984
- 41) K. Nakamura, T. Seki, Y. Egawa, R. Miki, Y. Oda, T. Yamanoi, T. Seki, *Chem. Pharm. Bull.*, 61, 11, 1188-1191, 2013
- 42) T. Bednarikova, Z. Tosner, J. Horsky, J. Jindrich, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 81, 141-152, 2015
- 43) S. Mohamad, K. Chandrasekaram, F. L. M. Rasdi, N. Suhana A. Manan, M. Raov, N. Sidek, S. F. Fathullah, *J. Mol. Liq.*, 212, 850-856, 2015
- 44) T. Terao, S. Maeda, A. Saika, *Macromolecules*, 16, 1535-1538, 1983
- 45) T. Uyar, E. Aslan, A. E. Tonelli, J. Hacaloglu, *Polym. Degr.*, 91, 1-11, 2006
- 46) T. Uyar, C. C. Rusa, X. Wang, M. Rusa, J. Hacaloglu, A. E. Tonelli, *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.*, 43, 2578-2593, 2005

- 47) 山名 月中 編, 「医薬品速度論」, 南江堂(東京), 1979
- 48) K. M. Gerke, R. C. Sidle, D. Mallants, *J. Hydrol. Hydromech.*, 61, 4, 313–325, 2013
- 49) R. Wilson, A. P. F. Turner, *Biosensors & Bioelectronics*, 7, 165-185, 1992
- 50) Q. H. Gibson, B. E. P. Swoboda, V. Massey, *J. Biol. Chem.*, 239, 11, 3927-3934, 1964
- 51) J. Li, A. Dirisala, Z. Ge, Y. Wang, W. Yin, W. Ke, K. Toh, J. Xie, Y. Matsumoto, Y. Anraku, K. Osada, K. Kataoka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56, 14025 –14030, 2017
- 52) M. Ikeda, T. Tanida, T. Yoshii, I. Hamachi, *Adv. Mater.*, 23, 2819-2822, 2011
- 53) M. Ikeda, T. Tanida, T. Yoshii, K. Kurotani, S. Onogi, K. Urayama, I. Hamachi, *Nature Chemistry*, 6, 511-518, 2014