

シクロデキストリンと共重合体を組み合わせた  
新規分子複合体の開発

小林 由希



## 目次

略語一覧	…1
緒言	…4
第 1 章 シクロデキストリンとブロック共重合体からなる複合粒子の調製	…9
第 1 節 ブロック共重合体を用いた微粒子の調製と評価	…11
第 2 節 ブロック共重合体と CyD を用いた複合粒子の調製と評価	…14
第 3 節 ゲスト化合物の導入による一次粒子の再生の評価	…18
第 4 節 小括	…21
第 2 章 薬物包接能を有するゲルのワンポット調製	…22
第 1 節 ビニル基修飾 $\beta$ -CyD の合成	…24
第 2 節 ビニル基修飾 $\beta$ -CyD とイソプレンの共重合による $\beta$ -CyD 固定化ゲルの調製	…25
第 3 節 $\beta$ -CyD 固定化ゲルの物性評価と構成成分の調査	…28
第 4 節 $\beta$ -CyD 固定化ゲルへのゲスト化合物の取り込みと放出の評価	…34
第 5 節 小括	…35

第 3 章 機能性スライドリングゲルのワンポット調製	…36
第 1 節 スライドリングゲルの物性評価	…37
第 2 節 ビニル基修飾 $\beta$ -CyD と機能性モノマーの共重合による スライドリングゲルの調製	…39
第 3 節 刺激応答性の検討	…42
第 4 節 小括	…45
総括	…46
謝辞	…49
実験の部	…51
参考文献	…59

## 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．

4-V-PBA	4-ビニルフェニルボロン酸 4-Vinylphenylboronic acid
AAm	アクリルアミド Acrylamide
AdA	1-アダマンタンアミン 1-Adamantanamine
AdC	1-アダマンタンカルボン酸 1-Adamantancarboxylic acid
APS	過硫酸アンモニウム Ammonium peroxodisulfate
BtPPG	ポリプロピレングリコールモノブチルエーテル Poly(propylene glycol) monobutyl ether
BtPPG-PCL	モノブチルポリプロピレングリコールとポリカプロ ラクトンによるジブロック共重合体 Di-block copolymer of mono-butyl poly(propylene glycol)- block poly(caprolactone)
$\epsilon$ -CL	$\epsilon$ -カプロラクトン $\epsilon$ -Caprolactone
CyD	シクロデキストリン Cyclodextrin
DC	デオキシコール酸ナトリウム Sodium deoxycholate
DDS	ドラッグデリバリーシステム Drug delivery system
DMF	<i>N,N'</i> -ジメチルホルムアミド <i>N,N'</i> -Dimethylformamide
Fru	フルクトース Fructose
Glc	グルコース Glucose

HEPES	2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペリジン]エタンスルホン酸 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
LCST	下限臨界共溶温度 Lower critical solution temperature
MBAAm	<i>N,N'</i> -メチレンビスアクリルアミド <i>N,N'</i> -Methylenebisacrylamide
MeOH	メタノール Methanol
NaC	コール酸ナトリウム Sodium cholic acid
NaDC	デオキシコール酸ナトリウム Sodium deoxycholic acid
NIPAAm	<i>N</i> -イソプロピルアクリルアミド <i>N</i> -Isopropylacrylamide
PCL	ポリカプロラクトン Poly(caprolactone)
PEG	ポリエチレングリコール Poly(ethylene glycol)
PG	プロピレングリコール Propylene glycol
PPG	ポリプロピレングリコール Poly(propylene glycol)
PHL	ポリヘキサノラクトン Poly(6-hexanolactone)
pPRX	シュードポリロタキサン Pseudo-polyrotaxane
pRX	シュードロタキサン Pseudo-rotaxane
PRX	ポリロタキサン Polyrotaxane
RX	ロタキサン Rotaxane
SRG	スライドリングゲル Slide-ring gel
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -テトラメチルエチレンジアミン <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine

TBC	4- <i>tare</i> -ブチルピロカテコール 4- <i>tare</i> -Buthylpyrocatechol
THF	テトラヒドロフラン Tetrahydrofuran
TNS	6-パラトルイジノ 2-ナフタレンスルホン酸 6-( <i>p</i> -Toluidino)2-naphthalenesulfonic acid
V- $\beta$ -CyD	モノビニル $\beta$ -シクロデキストリン Mono-vinyl $\beta$ -cyclodextrin

## 緒言

分子マシンは、ミクロスケール、ナノスケールで制御された機械的動きを起こす分子、あるいは分子複合体をいう<sup>1</sup>。なかでも合成分子マシンは、有機化学的に合成された分子マシンであり、熱、光、pH 変化、酸化還元などの外部刺激に応じて分子の構造や配座が変化するものをいう<sup>1-5</sup>。このような合成分子マシンは、生体適合性や生分解性を持たせることでドラッグデリバリーシステム (DDS) の基剤への応用も検討されており、これらの技術が医薬品開発や最先端治療の助けになることが期待されている<sup>6-8</sup>。

近年、DDS への応用が検討されている基剤のひとつに、多数の環状分子が鎖状高分子を包接して形成されるシュードポリロタキサン (pPRX) や、その末端をストッパー分子で封じたポリロタキサン (PRX) があり (Fig. 1)、この環状分子に、シクロデキストリン (CyD) を用いた pPRX および PRX についても様々な研究が報告されている<sup>9-10</sup>。

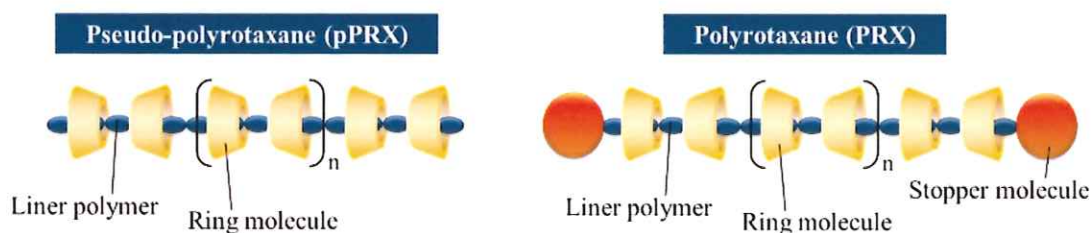
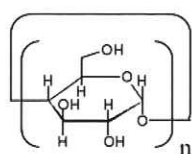


Fig. 1 Structure of pPRX and PRX.

### Cyclodextrin (CyD)






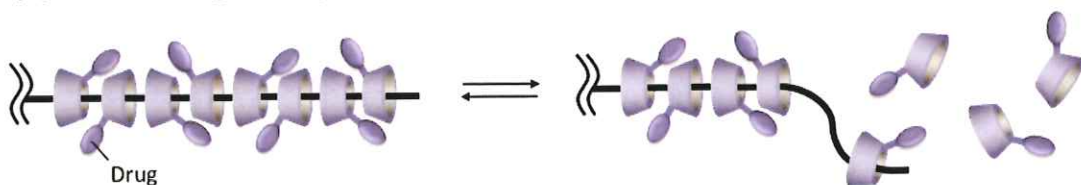
	 $\alpha$ -CyD	 $\beta$ -CyD	 $\gamma$ -CyD
Number of Glucose units	6	7	8
Cavity Diameter (Å)	4.7	6.0	7.5

Fig. 2 Structure of CyDs.

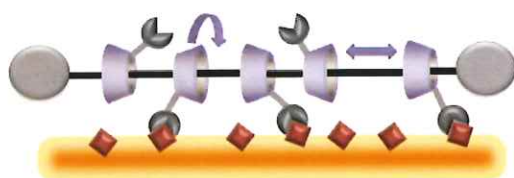


CyD は、複数の D-グルコースが  $\alpha$ -1,4 グリコシド結合することにより環状構造を形成した分子であり、構成する D-グルコースの数が 6, 7, 8 個のものを、それぞれ  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CyD と呼ぶ (Fig. 2). CyD は、環状構造の空孔内にゲスト分子を取り込み、包接複合体を形成するという特徴を持つ<sup>11-13</sup>. CyD は、低分子のみならず、ポリエチレングリコール (PEG) やポリプロピレングリコール (PPG) などの鎖状高分子も包接し、pPRX を形成する<sup>14-21</sup>. pPRX を構成する CyD と鎖状高分子の間には化学結合が存在せず、CyD は鎖状高分子上をスライドすることや回転することができる. ストッパー分子を持たない pPRX は、CyD のスライドにより溶媒中で可逆的な脱包接が生じ得る. この特性を活用した合成分子マシンには、薬剤を徐々に放出する DDS 基剤などがある (Fig. 3 (A)). 一方、PRX は両端のストッパー分子により CyD の脱包接は生じない. この特性を活用した合成分子マシンには、効率の良い基質認識能を持つ多価リガンドや、環状分子同士を架橋した環動ゲルなどがある (Fig. 3 (B), (C)).

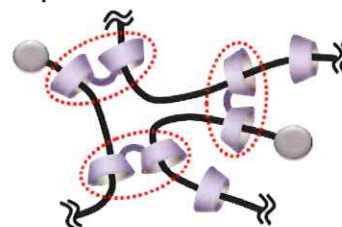
(A) DDS base to gradually release the drug



(B) Multivalent ligand with efficient substrate recognition ability



(C) Slide-ring gels in which cyclic molecules are crosslinked



**Fig. 3** Application examples of pPRX or PRX as synthetic molecular machine.

そこで本研究ではこれらの特徴を活用し、高い機能を有する DDS に利用可能な機能性材料として、CyD と共重合体を組み合わせた pPRX もしくは PRX 構造を持つ新規材料の開発を目的とした。共重合体とは、異なる 2 種類以上の単量体が重合することで得られる重合体を指す<sup>22</sup>。

第 1 章では、CyD とブロック共重合体からなる機能性複合粒子の調製を目的とした。ブロック共重合体とは、2 種類以上の単量体からなる重合体のうち、それぞれ同種の単量体からなる高分子鎖が 1 本の鎖の中に結合している重合体をいう<sup>23</sup>。なかでも、親水性連鎖と疎水性連鎖を組み合わせた両親媒性ブロック共重合体は、水中で球状ミセルを形成することも知られている<sup>24,25</sup>。PEG や PPG などの親水性を示すポリエーテルと、ポリカプロラクトン (PCL) やポリヘキサノラクトン (PHL) などの疎水性を示すポリエステルを組み合わせたブロック共重合体は、水中でミセルや粒子を形成することが予想できる。さらに、それぞれの鎖が各種 CyD と相互作用するため<sup>9,26</sup>、様々な pPRX を形成することも予想できる (Fig. 4)。そこで、複合粒子懸濁液に CyD の他のゲスト化合物を導入することで pPRX が崩壊し、一次粒子の再生が生じるか検討することにした。この pPRX の崩壊が可能になれば、粒子内または pPRX 同士で形成される空間に薬物を取り込ませることで、刺激応答性に加え、薬物の放出時間の制御も可能な DDS 基剤へ繋がると期待している。

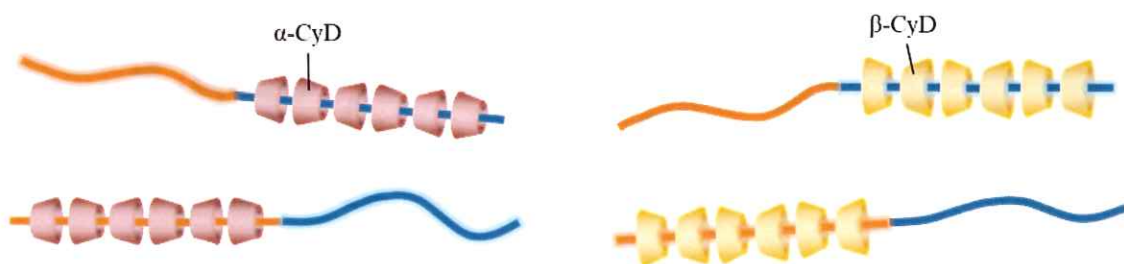


Fig. 4 Examples of pPRX with block-copolymer and CyDs.

第 2 章では、ビニル基修飾 CyD とビニルモノマーを用いた CyD 固定化ゲルの調製を目的とした。ゲルは、溶媒に不溶の三次元構造を持つ高分子およびその膨潤体であり<sup>27</sup>、高分子同士の架橋には、共有結合などの化学的な結合だけでなく、水素結合や静電的相互作用などの物理的な相互作用も利用されている。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ことや、他の官能性化合物を用いて高分子同士を架橋することで調製する。一方、物理架橋ゲルは主鎖となる高分子同士での水素結合の形成や、高分子鎖上に存在する部分電荷と反するイオンの添加により発生する静電的引力など、様々な方法で調製される<sup>28,29</sup>。一般に、このようなゲルによる薬物放出には、水溶性のハイドロゲルが広く用いられている。しかしこの薬物放出は、水で満たされている網目構造中の薬物の拡散によって起こり、分子の大きさに依存して拡散の度合いが異なる。一方、ゲルの中に CyD を固定化した CyD 固定化ゲルができれば、CyD の包接能に依存した放出の抑制や、ゲスト化合物の共存による放出の促進といった、新たな放出制御機能を有するゲルとなる可能性がある。そこで、高分子鎖上に CyD を固定化し、かつ一部の CyD が共重合体を包接する物理的架橋点となる CyD 固定化ゲルを、ビニル基を一つ持つ CyD と主鎖となるビニルモノマーを共重合することによりワンポットで調製することとした。

第 3 章では、機能性スライドリングゲル (SRG) のワンポット調製を目的とした。SRG は架橋点が動くため、応力緩和性があり、力学的ストレスに強いなどのユニークな力学特性を示す。また、刺激応答性などの機能を付加しやすいといった利点も挙げられる。この SRG の材料の一つに pPRX や PRX が用いられており<sup>30-32</sup>、それらの構造を持つスライドリングゲルとしては、架橋点にロタ

キサン構造を持つゲルや、PRX の環状分子同士を架橋したゲルが報告されているが<sup>30,33</sup>、これらの調製には、シュードロタキサンの調製、ストッパー分子の導入、架橋の形成など多数のステップを要し、容易ではない。そこで第 3 章では、第 2 章で開発したゲルのワンポット調製法を活用し、その架橋密度をコントロールすることで、架橋のスライドによる膨潤をコントロールすることとした。スライド機能の付与には、包接複合体の形成が可能である CyD の空孔のサイズに適したモノマーの選択と、CyD に包接されなくても溶解し、重合が進む親水性モノマーの導入が必要となることが考えられる。また、スライド機能に加えて刺激応答性の機能を付与できれば、ダイナミックな応答が期待できる。そこで、機能性モノマーとビニル基を一つ持つ CyD を共重合することで、SRG の高機能化を試みた。

## 第 1 章 シクロデキストリンとブロック共重合体からなる

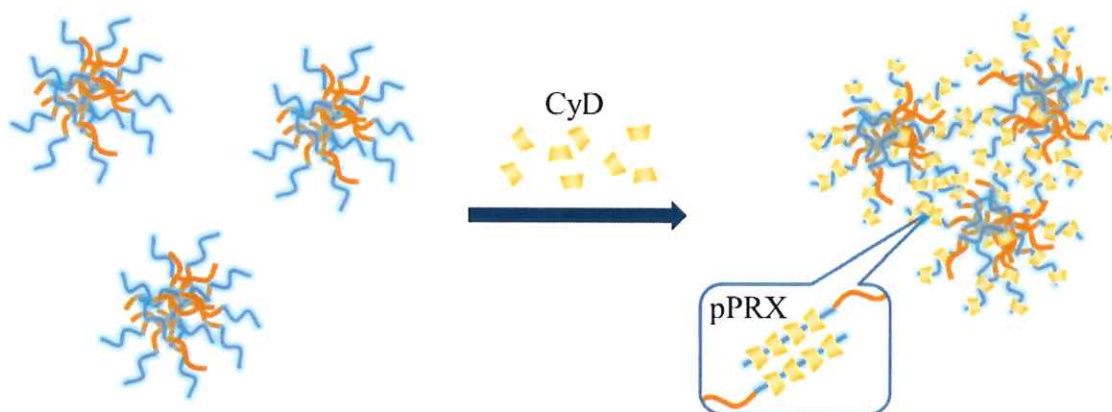
### 複合粒子の調製

共重合体とは、異なる 2 種類以上の単量体が重合することで得られる重合体を言うが、そのうちブロック共重合体は、同種の単量体からなる高分子鎖が長く連鎖したものをいう<sup>23</sup>。中でも、親水性連鎖と疎水性連鎖を組み合わせた両親媒性ブロック共重合体は、疎水性連鎖が多分子的に集合し、その外側に親水性連鎖が放射状に伸びた球状ミセルを形成することが知られている<sup>24,25</sup>。

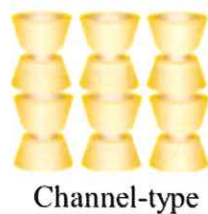
親水基として、PEG や PPG などのポリエーテルが、疎水基として、PCL や PHL などのポリエステルがあり、それらはそのサイズに適した組合わせの CyD と pPRX を形成する<sup>9,26</sup>。これらを共重合した共重合体は、それぞれの鎖が各種 CyD と相互作用するため、様々な pPRX を形成することも予想できる。

また前述のように、ポリエーテルとポリエステルを組み合わせた共重合体は、水中で球状ミセル、もしくは粒子を形成すると予想されるが、形成した粒子の外側の親水性連鎖と pPRX を形成する CyD を導入することにより、pPRX 同士が安定な結晶配列をとり粒子同士が凝集すると考え、複合粒子を調製することを本章の目的とした (Fig. 5)。この凝集部分の構造は、CyD が結晶中でとる集合様式の一つであるチャンネル型<sup>34</sup>と呼ばれる構造と予想される (Fig. 6)。

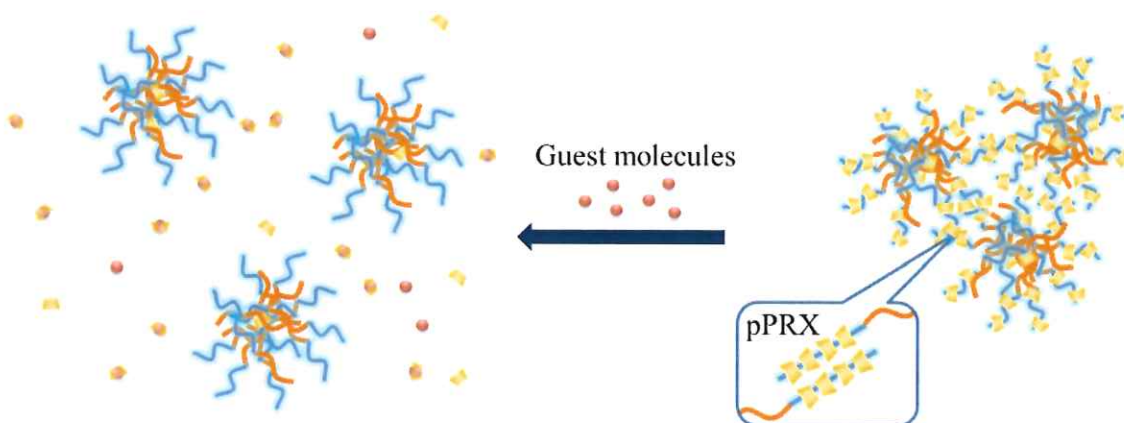
さらに CyD が脱包接する pPRX の特性を活用し、調製した複合粒子に CyD の他のゲスト化合物を導入することにより、複合粒子から一次粒子を再生させることが可能であるか、確認することも目的とした (Fig. 7)。



**Fig. 5** Illustration of forming composite particles.



**Fig. 6** An assembling mode of cyclodextrins in the crystals.



**Fig. 7** Illustration of dispersion composite particles.

## 第 1 節 ブロック共重合体を用いた微粒子の調製と評価

共重合体の調製には、PPG の片末端をブチル基に置換したポリプロピレングリコールモノブチルエーテル (BtPPG: Mw 2,500) を用い、そこに  $\epsilon$ -カプロラク톤 ( $\epsilon$ -CL) を開環重合<sup>35</sup> することにより、ブロック共重合体である BtPPG-PCL を得た (Fig. 8).

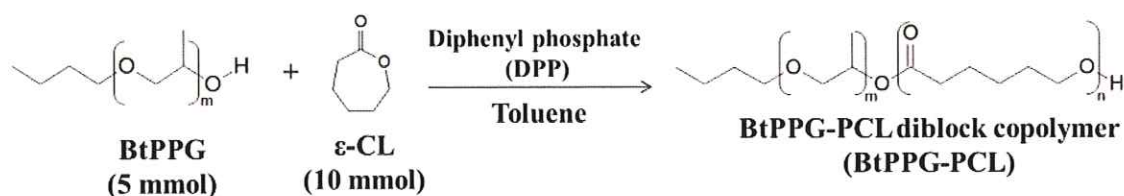


Fig. 8 Preparation of BtPPG-PCL.

調製した共重合体の分子量は  $^1\text{H-NMR}$  測定により算出し、約 10,300 であった (Table 1).

Table 1 Summary of composition and properties of BtPPG-PCL.

Time (hr)	Temperature (°C)	BtPPG : $\epsilon$ -CL	PGunit (m)	CLunit (n)	Mw (BtPPG)	Mw (PCL)	Mw (BtPPG-PCL)
6	90	1 : 2	42	68	2,500	7,800	10,300

Calculated by  $^1\text{H-NMR}$ .

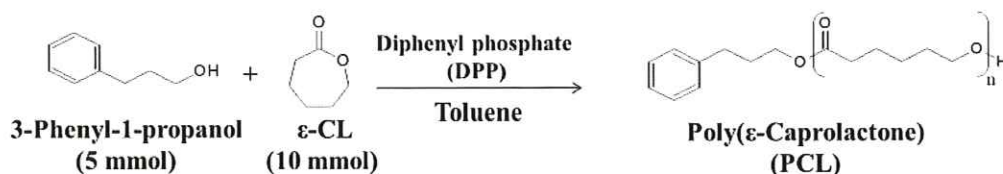
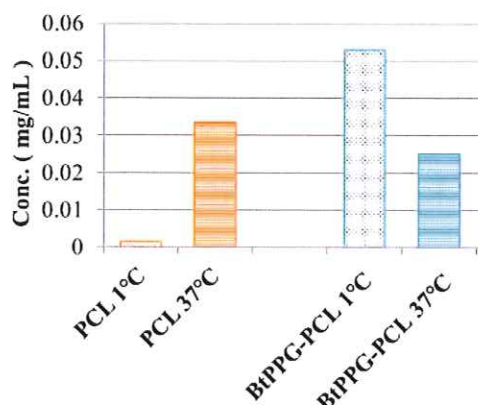


Fig. 9 Preparation of PCL.

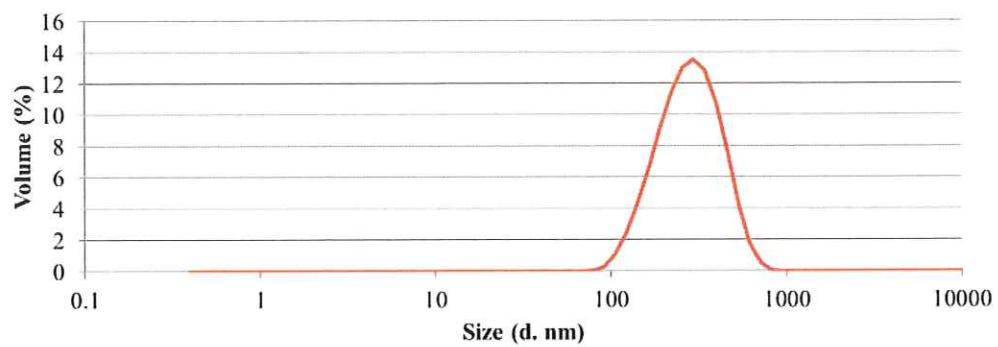


**Fig. 10** Effect of temperature on the solubility of the polymers in water.

調製した BtPPG-PCL と、比較のために調製した  $\epsilon$ -CL のホモポリマーである PCL (Fig. 9) の 1°C および 37°C における水への溶解性を比較すると、PPG を有さない PCL は 37°C でより高い溶解性を示したが、PPG との共重合体である BtPPG-PCL は 1°C でより高い溶解性を示した (Fig. 10). これは曇点を有する PPG の温度依存性によるものであると考えられた. この結果から、粒子の調製は PPG 鎖の溶解性の高い低温下で行うこととした.

両親媒性ブロック共重合体による粒子は、共重合体を水中に溶解し、疎水性相互作用による疎水基の会合により調製される. しかし、今回調製した BtPPG-PCL は、疎水性基である PCL 鎖が親水性基である PPG 鎖より長いため、親疎水性バランス (HLB; Hydrophilic-Lipophilic Balance) が疎水側に片寄っている. そのため、BtPPG-PCL を直接水中へ溶解することは困難であった. そこで、BtPPG-PCL を有機溶媒であるジクロロメタンに溶解して大量の水中へ滴下し、さらにジクロロメタンを蒸発することで粒子を調製した. 調製後の液について、動的光散乱法にて粒子径を測定した. その結果、100 nm 以下のサイズのナノミセルではなく、200 ~ 400 nm の粒子を形成することが示された (Fig. 11).





**Fig. 11** Size distribution of BtPPG-PCL particles.

## 第 2 節 ブロック共重合体と CyD を用いた複合粒子の

### 調製と評価

調製した BtPPG-PCL と CyD を用いて複合粒子の調製を行った。調製は  $\alpha$ ,  $\beta$  および  $\gamma$ -CyD 水溶液を用いて、粒子調製と同様の手順で行った。既に報告されている各種 CyD と PPG および PCL との pPRX 形成性<sup>14</sup> は、Table 2 で示した通りである。

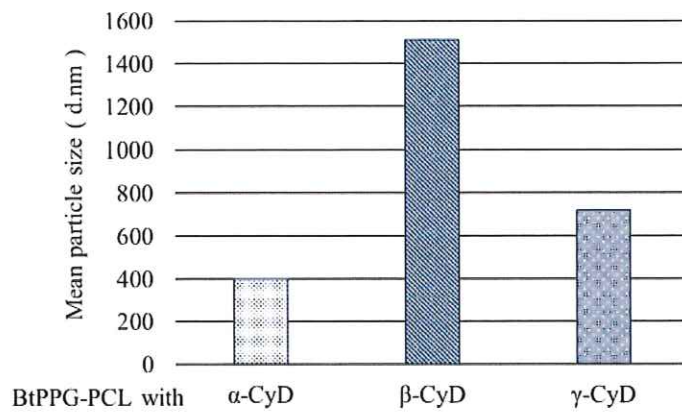
**Table 2** The formation of pPRX of various homopolymers and CyD.

	$\alpha$ -CyD	$\beta$ -CyD	$\gamma$ -CyD
PPG	$\Delta$	$\circ$	$\circ$
PCL	$\circ$	$\Delta$	$\circ$

$\circ$  : easy formation of pPRX

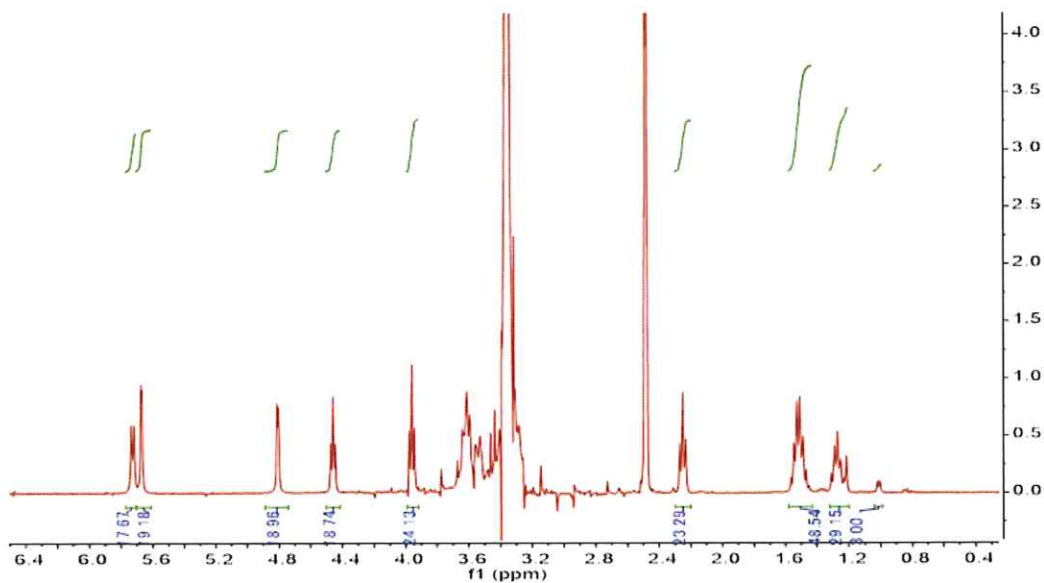
$\Delta$  : difficult formation of pPRX

CyD の種類を変えて粒子を調製した結果、 $\beta$  または  $\gamma$ -CyD 水溶液を用いて調製した溶液は白濁していた。またそれぞれの溶液の粒子径を測定した結果、外側の PPG 鎖と pPRX を形成する CyD を用いた場合のみ、大きい粒子の形成が確認できた (Fig. 12)。従って、粒子形成の過程において pPRX が生じ、またそれらが相互作用した結果であると考えられた。この pPRX 形成性と粒子径測定の結果から、ここからの実験は  $\beta$ -CyD を用いて実験を進めることとした。



**Fig. 12** Size distribution of  $\alpha$ -CyD,  $\beta$ -CyD and  $\gamma$ -CyD/BtPPG-PCL particles.

$\beta$ -CyD 水溶液を用いて調製した複合粒子を、メンブレンフィルターを用いて回収し、 $^1\text{H-NMR}$  による測定を行った。その結果、共重合体由来のプロトンだけでなく CyD 由来のプロトンも確認できたことから、複合粒子の形成には CyD が関与していることを確認した (Fig. 13)。



**Fig. 13**  $^1\text{H-NMR}$  Spectra of  $\beta$ -CyD/BtPPG-PCL composite particle in  $\text{DMSO-}d_6$ .

またそれらのプロトンの積分比から、BtPPG-PCL 鎖 1 本に対して  $\beta$ -CyD は約 43 個存在していることが分かった。 $\beta$ -CyD は PPG 鎖のプロピレングリコール (PG)2 ユニットに対して 1 個包接される。本実験で用いた BtPPG-PCL は、PG が約 42 ユニットからなる重合体であり、この共重合体を用いた複合粒子では、共重合体 1 本あたり  $\beta$ -CyD が 21 個包接された場合包接率 100% とする。これまでの条件 (sample 4) で調製した複合粒子の包接率は 205% と  $\beta$ -CyD が過剰に存在していた。したがって  $\beta$ -CyD は pPRX としてだけではなく、複合粒子内部にも存在していると考えられた。そのため、粒子を調製する  $\beta$ -CyD 水溶液の濃度を変えて複合粒子を調製した結果、 $\beta$ -CyD 水溶液の濃度に依存した包接率が確認できた (Table 3)。また、粒子径測定の結果から複合粒子の形成も確認できた。

**Table 3** Results of  $\beta$ -CyD/BtPPG-PCL composite particles.

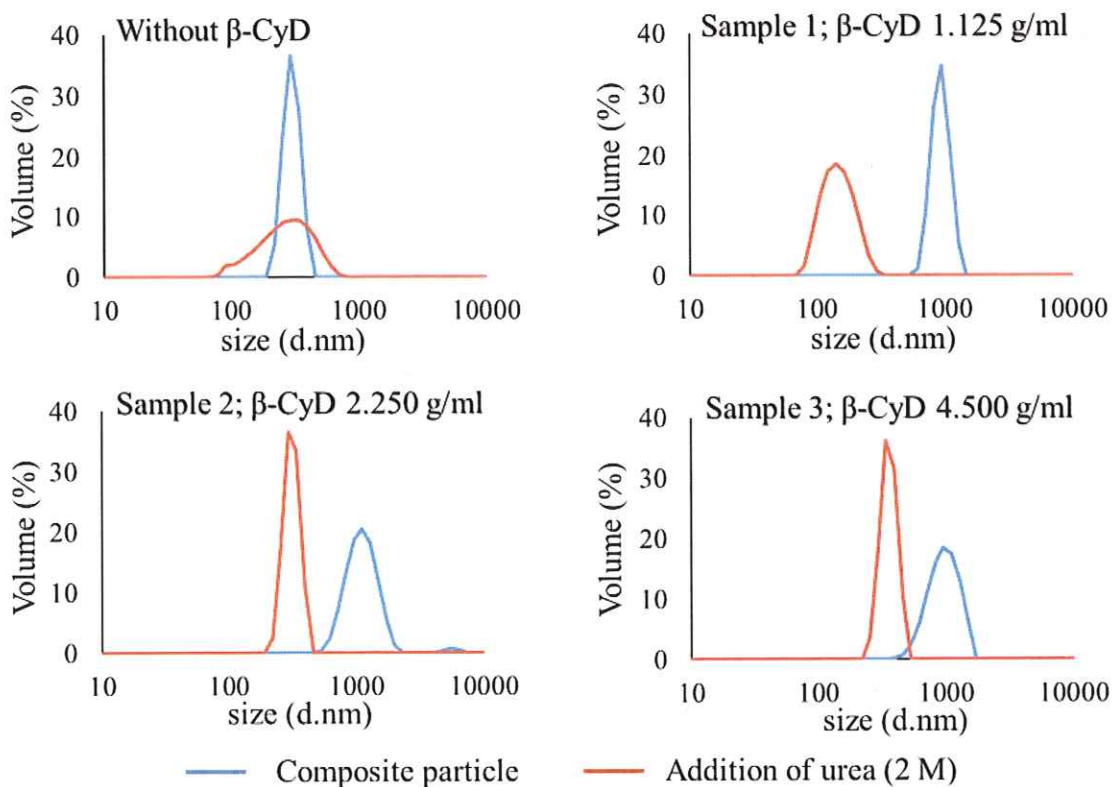
Sample	Concentration of $\beta$ -CyD (mg/mL)	Quantity of $\beta$ -CyD*	Coverage ratio* (%)	Size (nm)
1	1.125	1.2	5.71	825
2	2.250	12	57.1	955
3	4.500	18	85.7	1281
4	9.000	43	204.6	1510

\* per one PPG

過剰に存在する CyD による影響を考慮し、今後の実験には CyD の包接率が 100% を超えない、3 条件 (sample 1~3) で調製した複合粒子を用いることとした。

調製した複合粒子が、CyD による pPRX 同士の水素結合による分子間相互作用であるかを確認するため、調製した複合粒子の懸濁溶液に、水素結合を弱めることが報告されている尿素を添加し<sup>36</sup>、その粒子径を評価した。

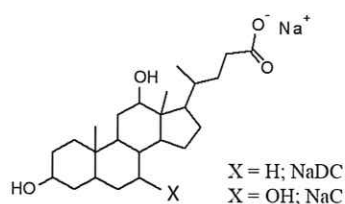
各種複合粒子の懸濁溶液に、2 mol/L 尿素を添加した結果、粒子径が約 1,000 nm の複合粒子は、約 300 nm となった。この粒子径は  $\beta$ -CyD を導入せずに調製した微粒子と同等の大きさであったことから、複合粒子から一次粒子が再生したと考えられた。また、CyD 非共存下で調製した一次粒子に 2 mol/L 尿素を添加した際には粒子径の変化は生じなかったことから、尿素の添加により CyD による pPRX 同士の相互作用が弱まり、それにより複合粒子から一次粒子が再生したと考えられた (Fig. 14)。これらの結果からも、複合粒子の形成には CyD と水素結合によるその相互作用が関与していることが明らかになった。



**Fig. 14** Change of the size distribution of the  $\beta$ -CyD/BtPPG-PCL composite particles depending on the urea.

### 第 3 節 ゲスト化合物の導入による一次粒子の再生の評価

ゲスト化合物導入による複合粒子から一次粒子の再生の評価を行った。ゲスト化合物には、CyD と包接複合体を形成することが報告されている胆汁酸であるデオキシコール酸ナトリウム (NaDC) と、コール酸ナトリウム (NaC) を用いた (Fig. 15)<sup>37-41</sup>。NaDC と  $\beta$ -CyD の結合定数は、4.79 及び 2.86 mol<sup>-1</sup> であり、NaC と  $\beta$ -CyD の結合定数は、3.50 mol<sup>-1</sup> であることが報告されている<sup>42</sup>。このことから分かるように、 $\beta$ -CyD との結合定数を 2 つもつ NaDC は  $\beta$ -CyD と 1:2 の、 $\beta$ -CyD との結合定数を 1 つもつ NaC は  $\beta$ -CyD と 1:1 の複合体を形成する。



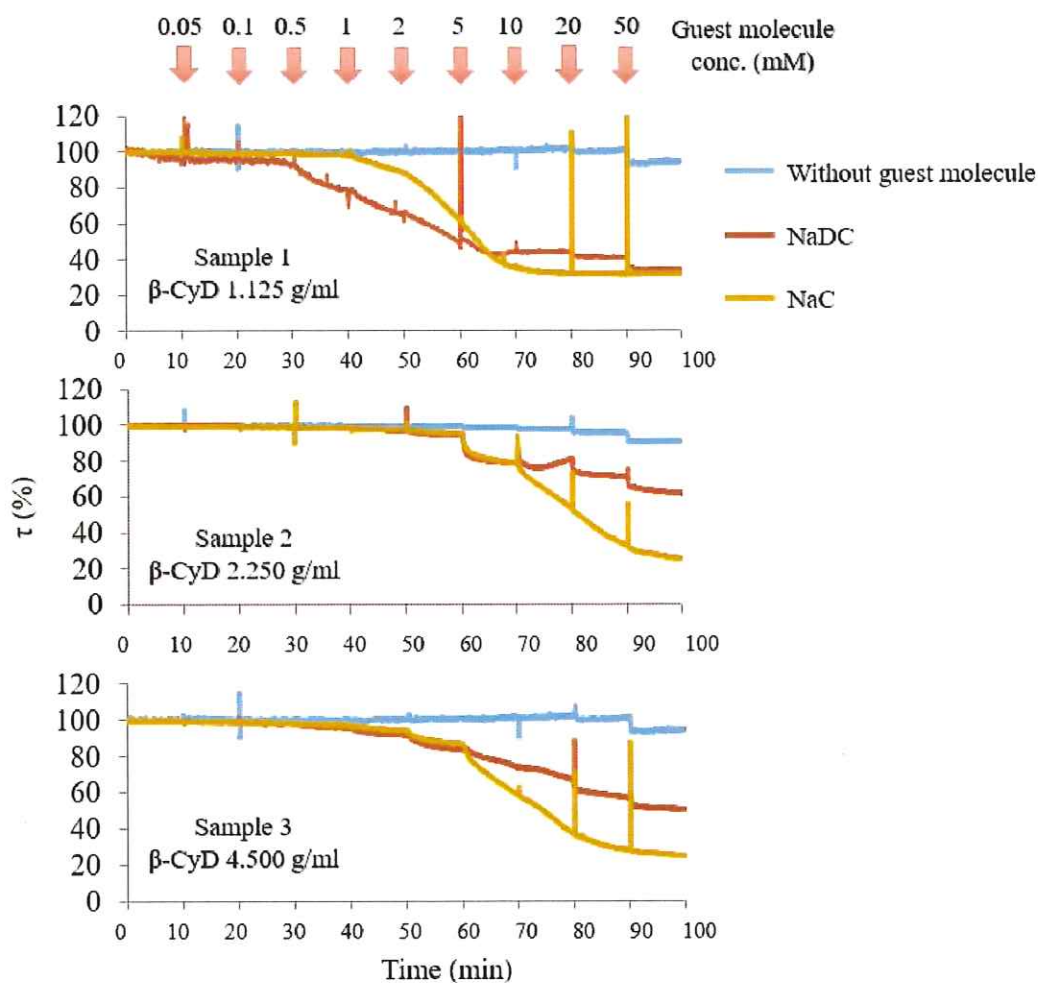
	<b>logK (mol<sup>-1</sup>)</b>	
NaDC	4.79	2.86
NaC	3.50	

**Fig. 15** Structure and the binding constants with  $\beta$ -CyD of NaDC and NaC.

本実験では、複合粒子を調製した懸濁溶液にゲスト化合物を添加することにより、複合粒子から一次粒子が再生して溶液の濁度が低下すると予想し、波長 700 nm の光を照射することで濁度を測定した。

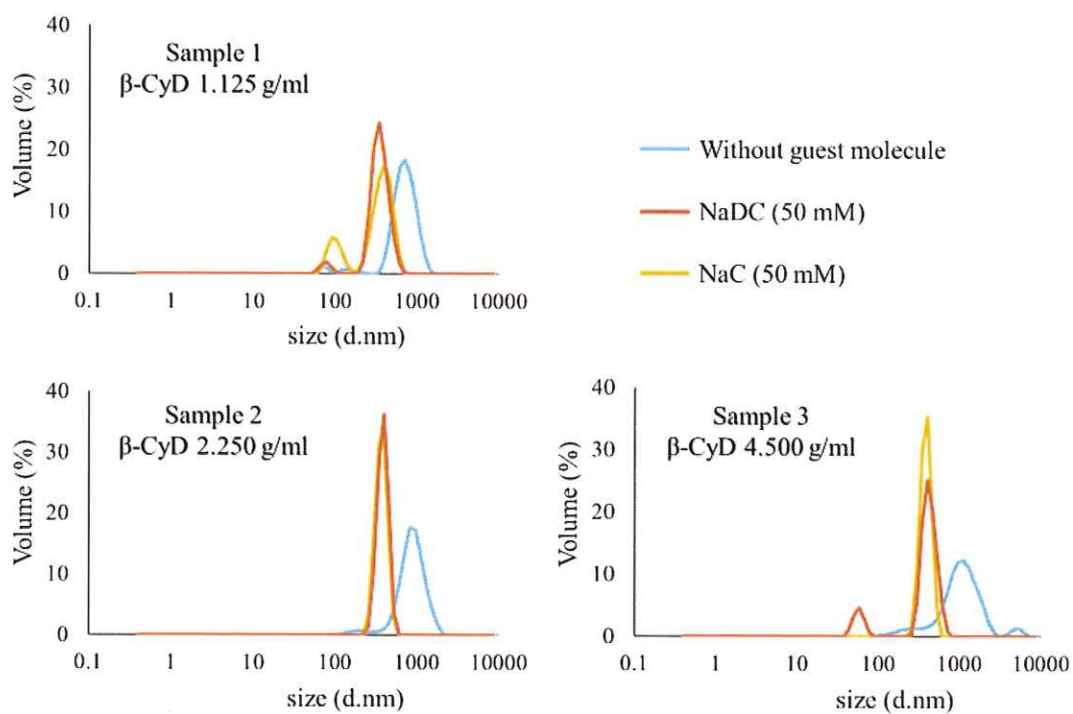
濁度試験の結果、何れの複合粒子でも NaDC または NaC の添加によ

り、濁度の低下が認められた (Fig. 16)。濁度の低下は  $\beta$ -CyD との結合定数が高い NaDC で、低濃度から観察された。一方、ゲスト化合物の濃度が 10 mM を超えると NaC 共存下でより高い濁度の低下がみられた。これは、NaC と  $\beta$ -CyD が 1:1 で包接体複合体を形成するのに対し、NaDC は  $\beta$ -CyD と 1:2 の複合体を形成することに由来していると考えられた。



**Fig. 16** The turbidity change of the  $\beta$ -CyD/BtPPG-PCL composite particles depending on the guest molecules concentration.

また、ゲスト化合物添加前とゲスト化合物を 50 mM 添加した溶液の粒子径を測定したところ、粒子径が約 1,000 nm の複合粒子は、ゲスト化合物 50 mM の添加により約 300 nm となっており、この粒子径は  $\beta$ -CyD を導入せずに調製した微粒子と同等の大きさであったことから、複合粒子から一次粒子が再生したと考えられた (Fig. 17).



**Fig. 17** Change of the size distribution of the  $\beta$ -CyD/BtPPG-PCL composite particles depending on the guest molecules concentration.



## 第 4 節 小括

CyD とブロック共重合体である BtPPG-PCL を用いて、複合粒子を調製することができた。粒子調製に際して、親水性基である PPG 鎖と pPRX を形成する組み合わせの場合のみ大きな粒子の形成が確認できたことから、粒子形成の過程において pPRX が生じ、またそれらが相互作用した結果であると考えられた。さらに、複合粒子に水素結合を弱める尿素を添加することで複合粒子から一次粒子が再生したことから、調製した複合粒子は CyD による pPRX 間の相互作用によるものであることを明らかにした。

また、複合粒子懸濁液に  $\beta$ -CyD のゲスト化合物である NaDC または NaC を添加することにより、溶液の濁度および粒子径が低下した。このことから、ゲスト化合物の添加により pPRX が崩壊し、一次粒子が再生すると考えられた。

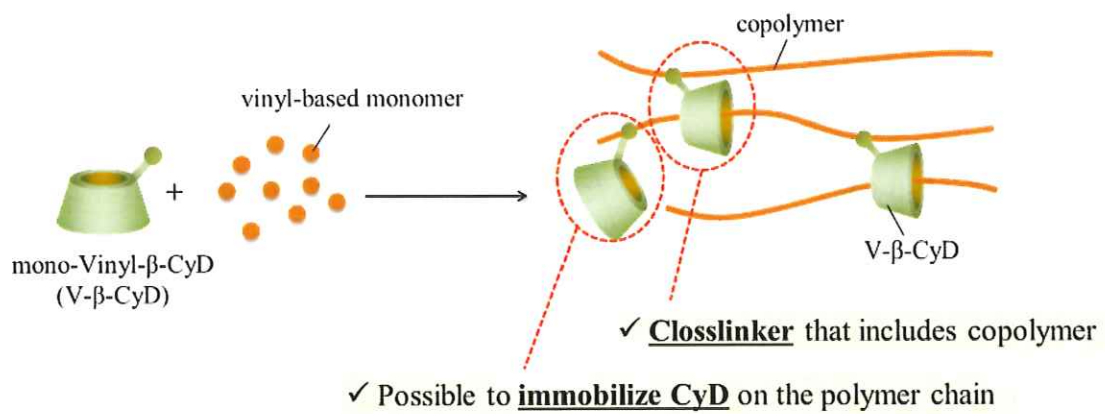
複合粒子の調製に際して添加する  $\beta$ -CyD の量を調整することで、その濃度に依存した包接率の複合粒子の形成が確認できた。このことから、過剰の CyD を粒子内に取り込ませることや、ゲスト化合物の添加による崩壊の速度をコントロールできると考えられた。

これらの複合粒子は、粒子内部への薬物取り込みとその徐放化、そして pPRX 間への薬物取り込みと腸内での薬物放出といった、徐放製剤化や腸溶製剤化によるバイオアベイラビリティの改善だけでなく、一次粒子が薬理作用を持つ化合物であれば、複合粒子の分散による一次粒子自体の薬理作用の発揮といった、プロドラッグ化による吸収改善も可能になることが期待できる。

## 第 2 章 薬物包接能を有するゲルのワンポット調製

ゲルによる薬物放出には、水溶性のハイドロゲルが広く用いられている。しかしこの薬物放出は、水で満たされている網目構造中の薬物の拡散によって起こり、その放出は分子の大きさに依存している。一方、ゲルの中に CyD を固定することができれば、CyD の包接能に依存した放出の抑制や、ゲスト化合物の共存による放出の促進といった新たな放出制御機能を有するゲルとなる可能性がある。

そこで第 2 章では、ビニル基を 1 つ持つ  $\beta$ -CyD (V- $\beta$ -CyD) と、ビニルモノマーを共重合することにより  $\beta$ -CyD 固定化ゲルをワンポットで調製することを目的とした。近年、CyD とビニルモノマーの共重合による pPRX または PRX のワンポット調製が報告されており<sup>43,45</sup>、本研究では V- $\beta$ -CyD を用いることで架橋が形成され、ワンポットでゲルの調製が可能になると期待した。ビニルモノマーには、そのポリマーが  $\beta$ -CyD と pPRX を形成することが報告されているイソプレンを選択した<sup>43,46</sup>。これらの共重合により、高分子鎖上に CyD を固定することが可能であり、かつ一部の V- $\beta$ -CyD が共重合体を包接する架橋点となる  $\beta$ -CyD 固定化ゲルを、ワンポットで調製できると考えた (Fig. 18)。ゲル中の V- $\beta$ -CyD は、CyD が共重合体から抜け落ちるのを防ぐストッパーの役割も果たしており、このゲルでは CyD が脱包接しない PRX の特性を活用している。



**Fig. 18** Structure of the gel composed of V- $\beta$ -CyD and vinyl-based monomers.

## 第 1 節 ビニル基修飾 $\beta$ -CyD の合成

はじめに, V- $\beta$ -CyD の合成を行った (Fig. 19).  $\beta$ -CyD の 6 位ヒドロキシ基に 2-イソシアネートエチルメタクリレートと反応させ, カラム精製により 1 置換体のみを得た. 本研究では, 以下この 1 置換体を V- $\beta$ -CyD と呼ぶ.

合成した V- $\beta$ -CyD は, FAB-MS,  $^1\text{H-NMR}$  および元素分析にて, 1 置換体であることを確認した (Figs. 20, 21).

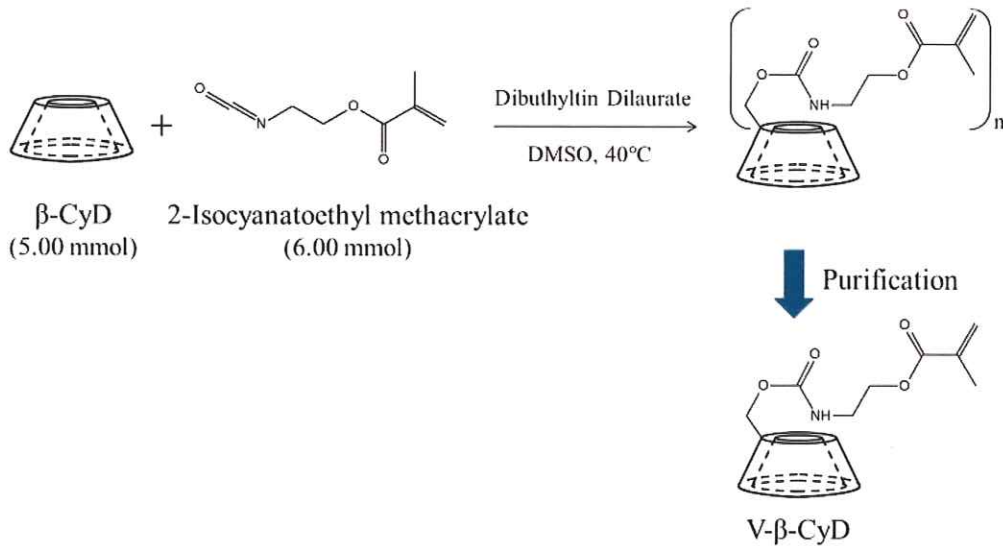


Fig. 19 Preparation of V- $\beta$ -CyD.

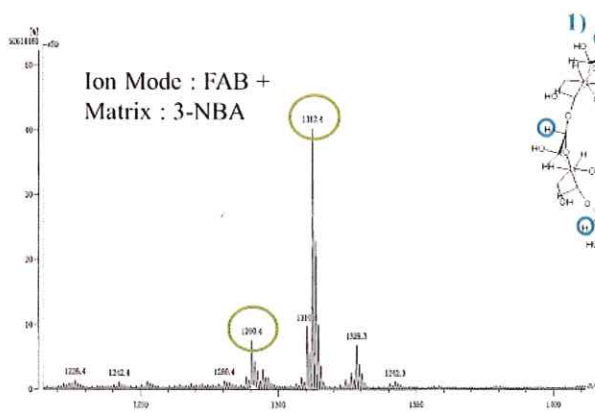


Fig. 20 FAB-MS spectrum of V- $\beta$ -CyD.

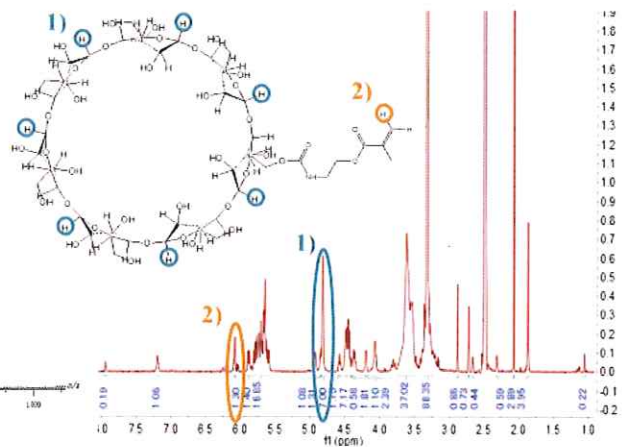


Fig. 21  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of V- $\beta$ -CyD in  $\text{DMSO-}d_6$ .

## 第 2 節 ビニル基修飾 $\beta$ -CyD とイソプレンの共重合による

### $\beta$ -CyD 固定化ゲルの調製

合成した V- $\beta$ -CyD とイソプレンを共重合し、 $\beta$ -CyD 固定化ゲルの調製を行った (Fig. 22).

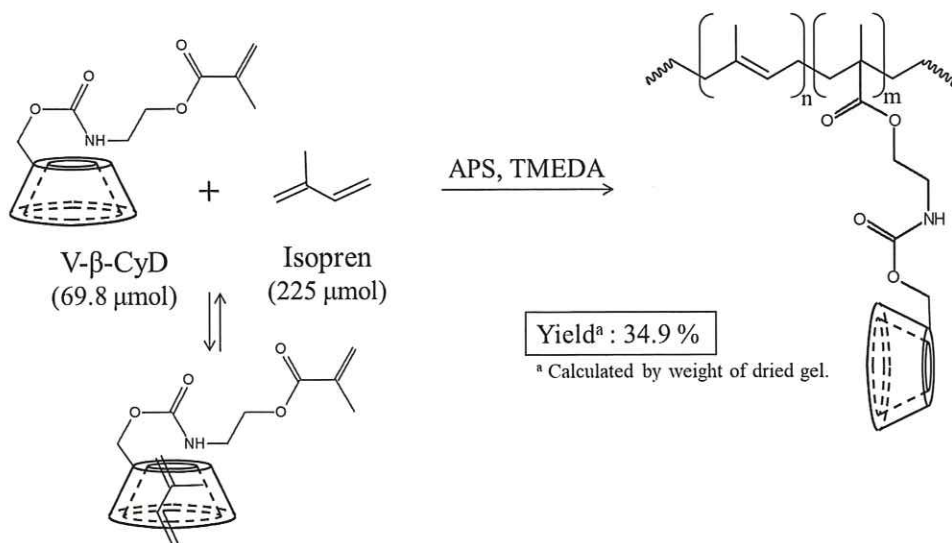
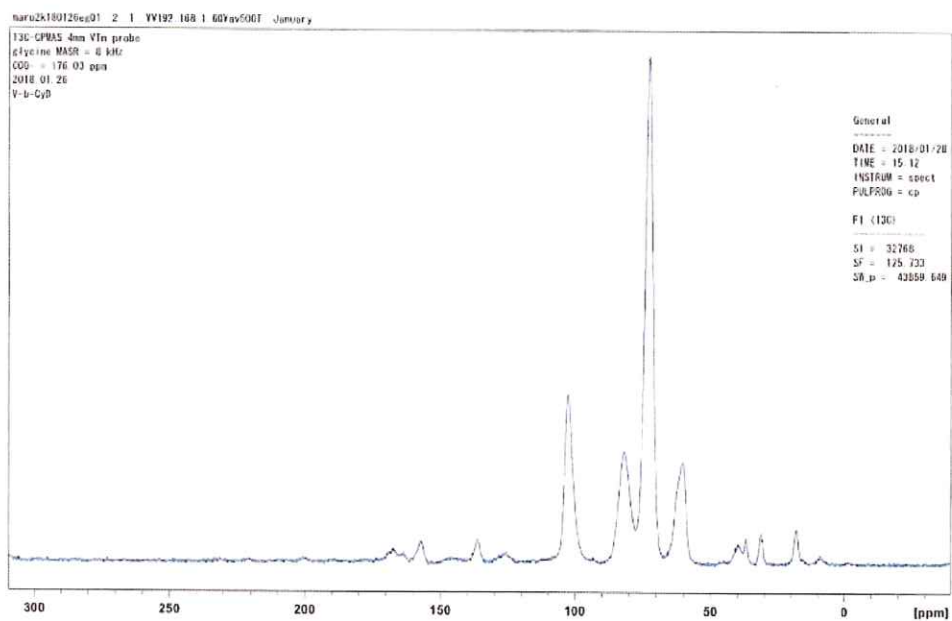


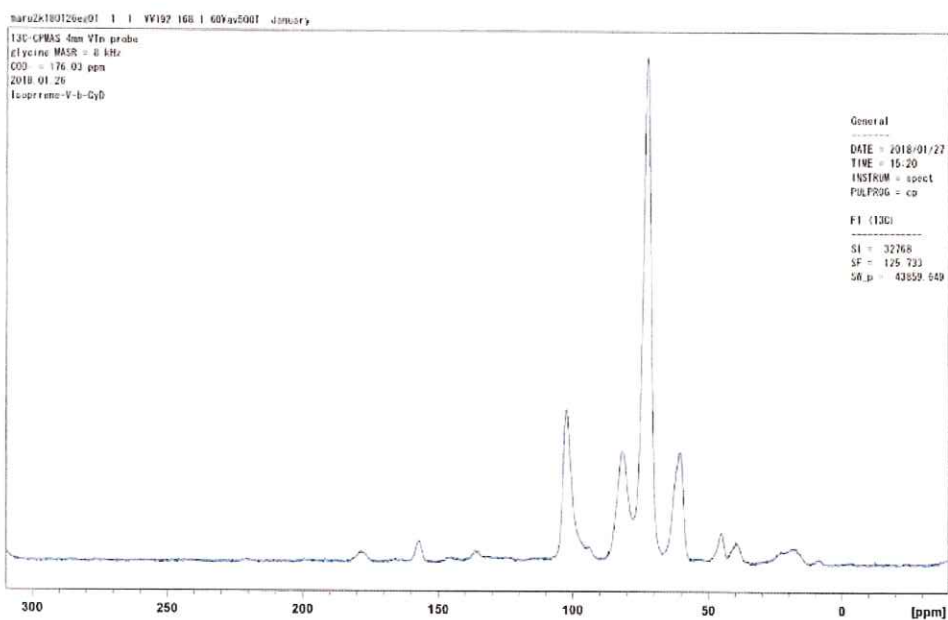
Fig. 22 Copolymerization of V- $\beta$ -CyD and isoprene.

重合反応の進行は、固体状態の  $^{13}\text{C}$ -NMR 測定により確認した (Fig. 23)<sup>47-49</sup>. Fig. 23 の (A) で示した V- $\beta$ -CyD のスペクトルでは、160-170 ppm 付近にメタクリレートのカルボニル炭素に由来するピークが確認できた. 一方, Fig. 23 (B) の V- $\beta$ -CyD とイソプレンを共重合したゲルのスペクトルでは、そのピークは消失し、180 ppm 付近に新たなピークが見られたことから重合反応が進んでいることが示唆された. また, Fig. 23 (B) の 10-30 ppm 付近に見られるブロードのピークは、ポリイソプレンの存在を示唆するものであると考えられた.

(A)

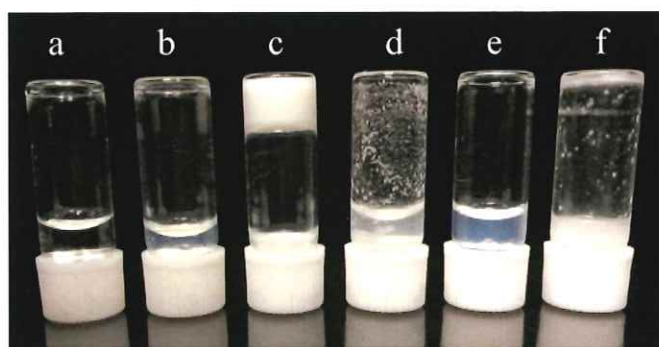


(B)



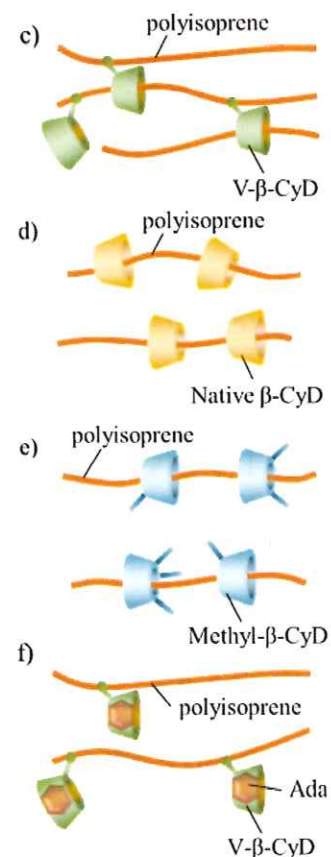
**Fig. 23** Solid-state  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectrum of V- $\beta$ -CyD (A) and the ground gel (B).

Fig. 24 に各種条件で重合反応を行った結果を写真として示す. V- $\beta$ -CyD とイソプレンの共重合により, c) に示すゲルを得ることができた. V- $\beta$ -CyD とイソプレンによる架橋が形成したゲルであるかを確認するため, a) イソプレンのみ, または b) V- $\beta$ -CyD のみを重合したが, ゲルの形成は確認できなかった. また V- $\beta$ -CyD ではなく, d) 修飾基のないネイティブの  $\beta$ -CyD または e) メチル基を修飾した  $\beta$ -CyD の共存下イソプレンを共重合したときには, ゲルの形成は確認できなかった. さらに, f) で示した  $\beta$ -CyD と親和性が高い 1-アダマンタンアミン (AdA)<sup>50</sup> の共存下, V- $\beta$ -CyD とイソプレンを共重合するとゲルは得られなかった. このことから, ビニルモノマーであるイソプレンが  $\beta$ -CyD の空孔内に包接され, 架橋点として機能していることが確認できた.



APS + TMEDA in 500  $\mu$ L water +

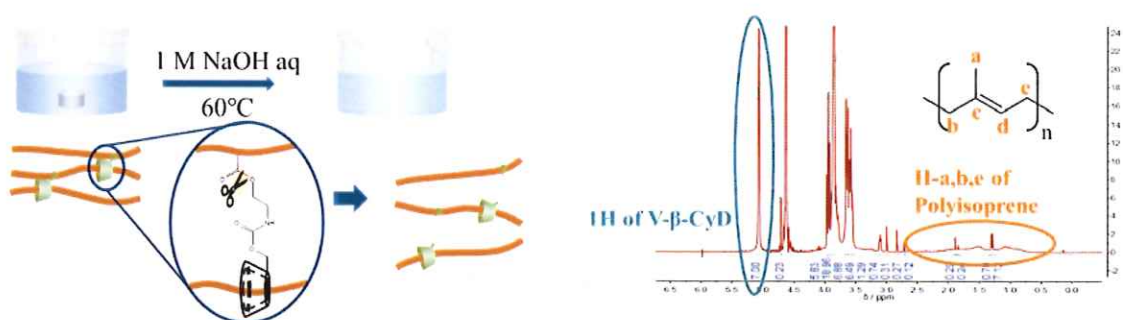
- a) Isoprene (225  $\mu$ mol)
- b) V- $\beta$ -CyD (69.8  $\mu$ mol)
- c) V- $\beta$ -CyD (69.8  $\mu$ mol) and isoprene (225  $\mu$ mol)
- d) Native  $\beta$ -CyD (69.8  $\mu$ mol) and isoprene (225  $\mu$ mol)
- e) Methyl- $\beta$ -CyD (69.8  $\mu$ mol) and isoprene (225  $\mu$ mol)
- f) V- $\beta$ -CyD (69.8  $\mu$ mol), isoprene (225  $\mu$ mol) and 1-adamantanamine (Ada) (69.8  $\mu$ mol)



**Fig. 24** Photographs of vials inverted after polymerization.

### 第 3 節 $\beta$ -CyD 固定化ゲルの物性評価と構成成分の調査

次に、得られたゲルの構成成分を調査した。ゲルを形成した固体状態での分析からでは構成成分を調査することができなかつたため、ゲルを 1 M 水酸化ナトリウム溶液に浸し、架橋部位のエステル結合を切断した。溶解を確認後、塩酸で中和して溶媒を減圧留去し、その残渣を重水に溶解して  $^1\text{H-NMR}$  測定を行った (Fig. 25).

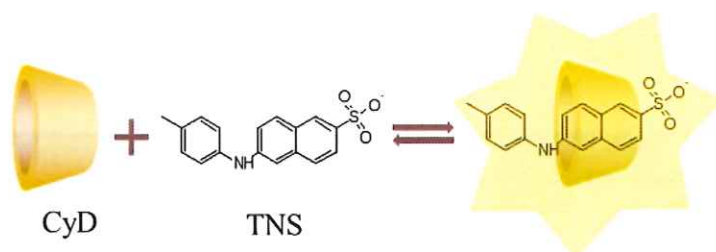


**Fig. 25** Analysis of the structure of V- $\beta$ -CyD/isoprene gel;  $^1\text{H-NMR}$  in  $\text{D}_2\text{O}$ .

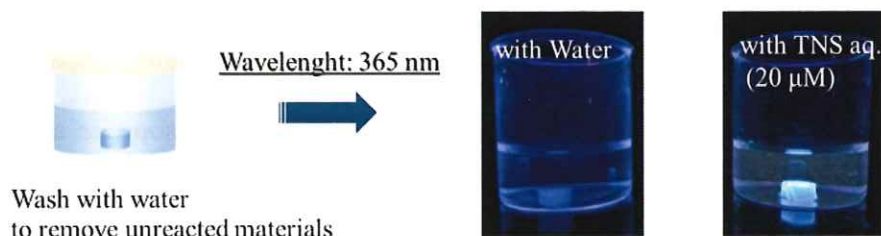
$\beta$ -CyD とポリイソプレンによる包接複合体は、 $\beta$ -CyD 1 個に対し、イソプレレンユニット約 1.5 個が包接される。今回調製したゲルの仕込み比は、V- $\beta$ -CyD とイソプレンが約 1:3 であり、仕込み量すべてが重合されると、全ての CyD が包接された構造で、フリーの CyD を含まないことも考えられる。しかし、 $^1\text{H-NMR}$  の結果をみてみると、CyD を構成するグルコースの 1 位のプロトンとイソプレレンの a, b, e のプロトンの比から、ゲルを構成する  $\beta$ -CyD とイソプレレンのユニット比は約 1:0.3 であり、ゲルの調製の過程で一部のイソプレンが失われており、この比から調製したゲルは包接複合体を形成していないフリーの CyD が多数存在していることが明らかとなった。



そこで、フリーの CyD の存在を確認するため、6-パラトルイジノ 2-ナフタレンスルホン酸 (TNS) を用いて調査を行った<sup>51</sup>. TNS は CyD と包接複合体を形成し、それにより蛍光を発することが知られている (Fig. 26). そのため、調製したゲルを水で洗浄して未反応物を取り除いた後に TNS 溶液に浸し、ゲルが蛍光を発するか調査した. その結果、ゲルを TNS 溶液に浸した場合に蛍光を確認できたことから、フリーの  $\beta$ -CyD がゲル中に存在して薬物包接能を保持していることが確認できた (Fig. 27).



**Fig. 26** Inclusion complex between  $\beta$ -CyD and TNS.

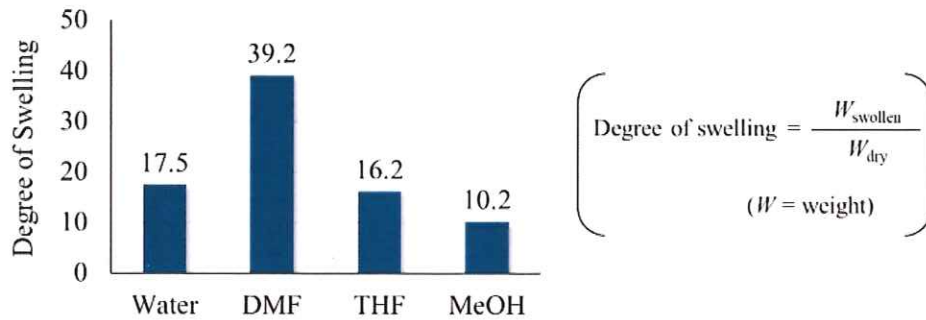


**Fig. 27** Analysis of the structure of V- $\beta$ -CyD/isoprene gel; TNS test.









さらに、調製したゲルを水、ジメチルホルムアミド (DMF)、テトラヒドロフラン (THF) と、メタノール (MeOH) の各種溶媒に浸し、平衡に達したゲルの質量と乾燥時の質量を用いて膨潤度を算出した (Fig. 28). また、ゲルの構成成分である  $\beta$ -CyD とポリイソプレンの各溶媒中における溶解性を調査したところ、 $\beta$ -CyD は DMF 中で、ポリイソプレンは THF 中で高い溶解性を示した. ゲルの

膨潤度は、ポリイソプレンの溶解性が高い THF 中ではなく、DMF 中で最も高い膨潤度を示しており、 $\beta$ -CyD の性質に大きく依存していることも示された。

### Swelling test



### Solubility test

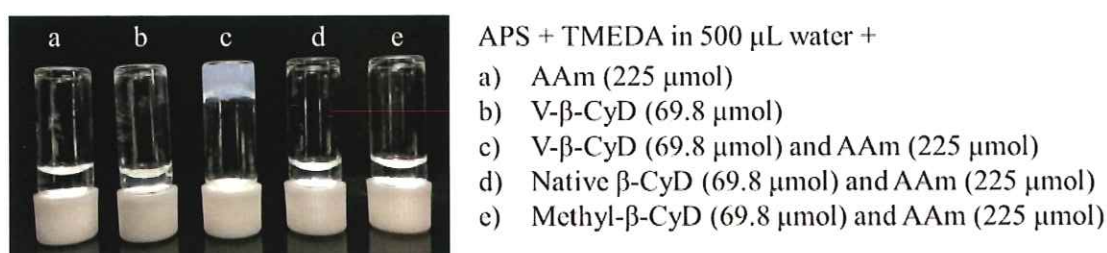
	Water	DMF	THF	MeOH
$\beta$ -CyD (270 mg / 10 mL)	 ○	 ⊙	 ×	 ×
Polyisoprene (324 ~ 351 mg / 40 mL)	 ×	 ×	 ○	 ×

⊙: very soluble, ○: soluble, ×: insoluble

**Fig. 28** Swelling degree of the gel composed of V- $\beta$ -CyD and isoprene and solubility of  $\beta$ -CyD and trans-polyisoprene.

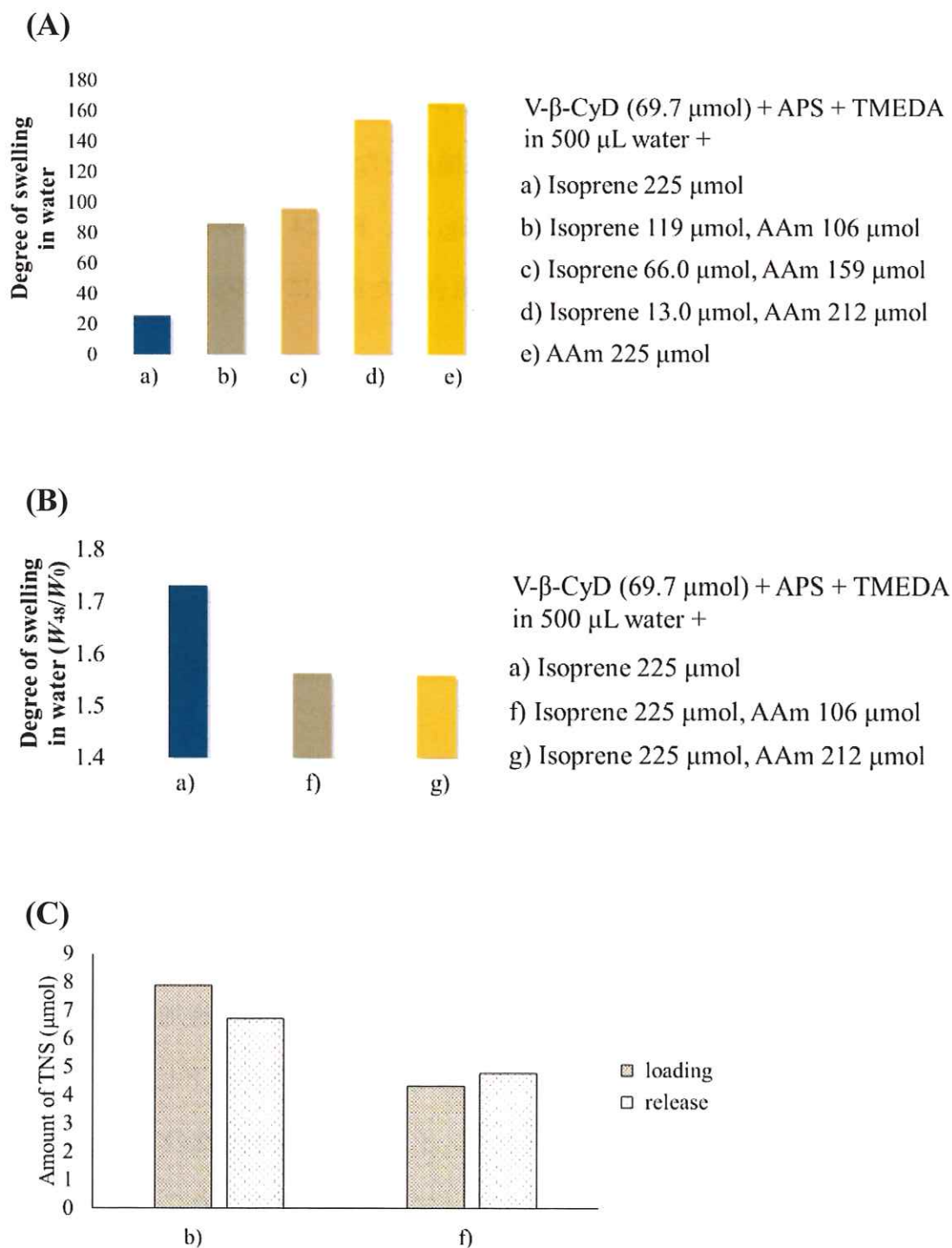
このようなゲルは、架橋密度やフリーの  $\beta$ -CyD 量を調節することで、膨潤度のコントロールが可能になると考えた。そこで、V- $\beta$ -CyD を減量してゲルを調製したところ、粘性のある液体が得られ、立体を保持できるゲルの形成が起これにくくなった。この結果から、イソプレンのような疎水性モノマーを用いた場合、モノマーを包接する CyD が減少すると、水中に溶解するモノマーの減少により架橋の形成が困難になり、ゲルが生じにくくなると考えられた。

そこで親水性モノマーであるアクリルアミド (AAm) を導入し、ゲルの架橋密度とフリーの  $\beta$ -CyD 量のコントロールを試みた。AAm と V- $\beta$ -CyD の共重合により、V- $\beta$ -CyD が AAm を包接して架橋点となりゲルが形成することは、イソプレンと同様の実験により確認した (Fig. 29)。Fig. 24 の結果と一致し、c) の条件、すなわち AAm と V- $\beta$ -CyD を共重合した場合にゲルが得られた。



**Fig. 29** Photographs of vials inverted after polymerization.

まず 1 つめに、V- $\beta$ -CyD に対しビニルモノマーの比率がこれまでと同様になるようにイソプレンと AAm の比率を変えてゲルを調製した。V- $\beta$ -CyD の量は変えずにイソプレンと AAm の比率を変えて調製したところ、ゲルの膨潤度は AAm の比率の増加に応じて高くなることが示された (Fig. 30 (A)). V- $\beta$ -CyD とビニルモノマーの比率が一定にもかかわらず AAm の比率の増加に応じて膨潤度が高くなったことから、AAm の共重合により架橋密度が低下し、フリーの  $\beta$ -CyD 量が増加していることが考えられた。イソプレンを水溶性の AAm に置換することで、合成時に失われるビニルモノマーの量が減少したことが考えられる。一方、架橋の形成数は増加していないことが推察できる。



**Fig. 30** Swelling degree of the gel composed of V- $\beta$ -CyD, isoprene and AAm (A), (B) and amount of loading and release of TNS (C).

一方、V- $\beta$ -CyD とイソプレンの量は変えずに AAm を追加して調製したゲルは、AAm を追加するとその膨潤度は低くなることが示された (Fig. 30 (B)). このゲルでは、AAm の共重合により架橋密度が増加し、フリーの  $\beta$ -CyD 量は減少していることが考えられた. AAm の共存により、イソプレンが CyD に包接された状態で効果的に重合に関与して、架橋数が増加したと推察できる.

Fig. 30 (A) の b) と、Fig. 30 (B) の f) のゲルを用いて、ゲル中の  $\beta$ -CyD への TNS の取り込みと放出について評価した. 調製したゲルを TNS 溶液に浸した後ゲルを取り出し、溶液中の TNS 量を測定した. 次に、取り出したゲルをゲスト化合物である Adamantanecarboxylic acid (AdC) の懸濁溶液に浸し、追出しによる TNS の放出量を測定した. b) と f) を比較した結果、TNS の取り込みと放出量は b) でより高い傾向が観察された (Fig. 30 (C)). この結果からも b) ではフリーの  $\beta$ -CyD 量は増加しており、f) では減少していることが示された.

イソプレンと AAm がランダムに重合した主鎖をもつゲルの膨潤度を比較した結果から、イソプレンと AAm について比較すると、包接による架橋形成能はイソプレンが優れている一方、水中での膨潤度は AAm が大きく寄与しており、AAm を共重合することは重合反応の進行に関わり、ゲルのフリーの  $\beta$ -CyD 量と膨潤性をコントロールするのに有効であることが分かった. これらのことから、共重合体の重合比を調整することによりゲル中のフリーの CyD 量を理想的にコントロールすることが可能であると示唆された.

## 第 4 節 $\beta$ -CyD 固定化ゲルへのゲスト化合物の取り込みと

### 放出の評価

イソプレンと  $\beta$ -CyD のみからなるゲルを用いて、ゲル中の  $\beta$ -CyD への TNS の取り込みと放出について評価した。測定は、第 2 章、第 3 節で行った実験と同様の方法で行った。ゲスト化合物には、 $\beta$ -CyD に高い親和性を持ち包接複合体を形成する 1) Adamantanecarboxylic acid (AdC), 2) Deoxycholic acid (DC), 3) 1-Adamantanamine (AdA) の 3 種類の化合物を用いた。これらの  $\beta$ -CyD 空孔内への親和性の高さは、AdC, DC, AdA の順となっている<sup>52,53</sup>。

はじめに TNS の取り込み量を測定した結果、多少のバラツキはみられたが、溶液に添加した量の約 19% の TNS が取り込まれていることが分かった。また放出量を測定した結果、ゲスト化合物によって TNS の放出率に大きな差が生じていた (Fig. 31)。この TNS の放出は、ゲスト化合物の  $\beta$ -CyD との結合定数に依存していたことから、TNS やゲスト化合物はゲル中のフリーの CyD の空孔内に取り込まれていると考えられた。

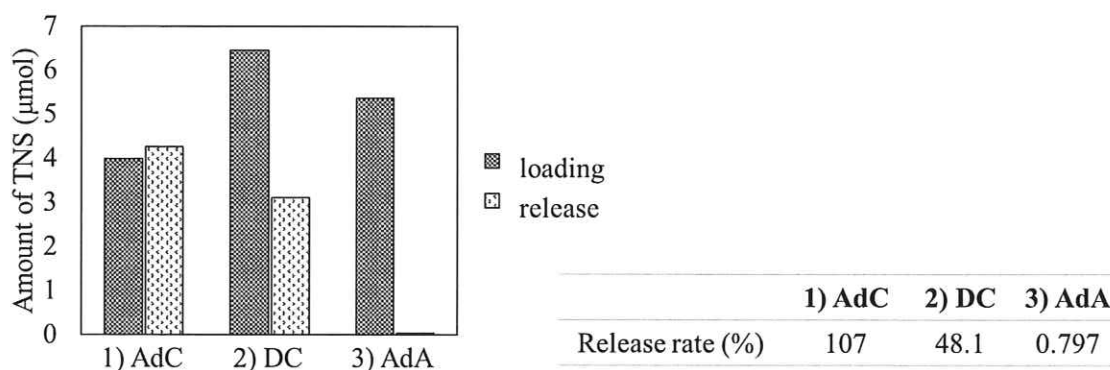


Fig. 31 Amount of loading and release of TNS.

## 第 5 節 小括

V- $\beta$ -CyD とイソプレンの共重合により、ワンポットで  $\beta$ -CyD 固定化ゲルを調製することができた。調製に用いた一部の V- $\beta$ -CyD は、主鎖となるビニルモノマーを包接することで架橋点として機能することが分かった。また、V- $\beta$ -CyD とイソプレンのみを共重合したゲルでは、イソプレンを包接していないフリーの CyD も多数存在しており、ゲル中に  $\beta$ -CyD を固定化することができた。そして、TNS を用いることで、フリーの CyD の定量化が期待できる。

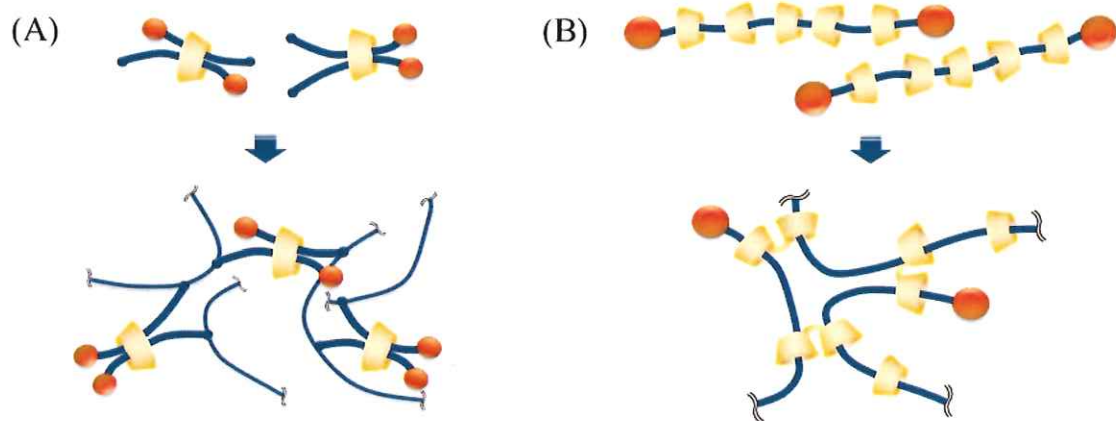
さらに、 $\beta$ -CyD 固定化ゲルの調製に際して AAm を共重合することで、その膨潤性やフリーの CyD 量をコントロールすることができた。また、フリーの CyD 空孔内へゲスト化合物を取り込み、そこに他のゲスト化合物を共存させることで CyD 空孔内からゲスト化合物を放出させることができた。

調製した CyD 固定化ゲルは、CyD の包接能に依存した放出の抑制やゲスト分子の共存による放出の促進といった、新たな放出制御機能を有するゲルになることが期待できる。また、フリーの CyD 空孔内にはゲスト化合物を取り込むことが可能であるため、体内の過剰なコレステロールを取り込むといった、経口投与などにより治療効果を発揮するゲルとしても期待できる。

### 第 3 章 機能性スライドラングゲルのワンポット調製

スライドラングゲル (SRG) は、架橋点が動くことによりユニークな力学特性を示す。応力緩和性があり、力学的ストレスに強く、また刺激応答性などの機能を付加しやすいといった利点がある。

この SRG の材料の一つに、環状分子 1 分子が鎖状高分子を包接して形成されるロタキサン (RX) や PRX が用いられている<sup>30-32</sup>。それらの構造を持つ SRG としては、架橋点に RX 構造を持つゲル (Fig. 32 (A)) や、PRX の環状分子同士を架橋したゲル (Fig. 32 (B)) が報告されているが<sup>30,33</sup>、これらの調製においては、ストッパー分子を持たないシュードロタキサン (pRX) や pPRX の調製に続き、ストッパー分子の導入、架橋の形成など多数のステップを要する。



**Fig. 32** Cross-linking chainlike polymers by CyD.

そこで第 3 章では、第 2 章で開発したゲルのワンポット調製法を活用し、その架橋密度をコントロールすることで架橋のスライドによる膨潤をコントロールすることとした。またスライド機能に加えて刺激応答性の機能を付与できれば、ダイナミックな応答が期待できると考え、刺激応答性を付与することも目的とした。



## 第 1 節 スライドリングゲルの物性評価

スライド機能の付与には, 包接複合体の形成が可能な CyD の空孔のサイズに適したモノマーの選択と, CyD に包接されなくても溶解して重合が進む親水性モノマーの導入が必要となる. そこで, 第 2 章で検討したイソプレンと AAm の比率をコントロールしたゲルを SRG として活用することとした.

SRG としての特性を確認するため, ゲルの応力を比較した. 測定には, イソプレンをメチレンビスアクリルアミド (MBAAm) で架橋し, 架橋点が固定された化学架橋のゲル (i) と, V- $\beta$ -CyD とイソプレンによるゲル (ii), そして AAm を導入したゲル (iii) を用いた. この 3 種類のゲルに, 直径 3 mm の円柱状の治具を使い, 1 mm のひずみを 10 分間加え続け, その際の応力を測定した. その結果, 応力は V- $\beta$ -CyD とイソプレンを共重合した ii で最も高く, 堅硬な架橋を形成していることが示された (Fig. 33).

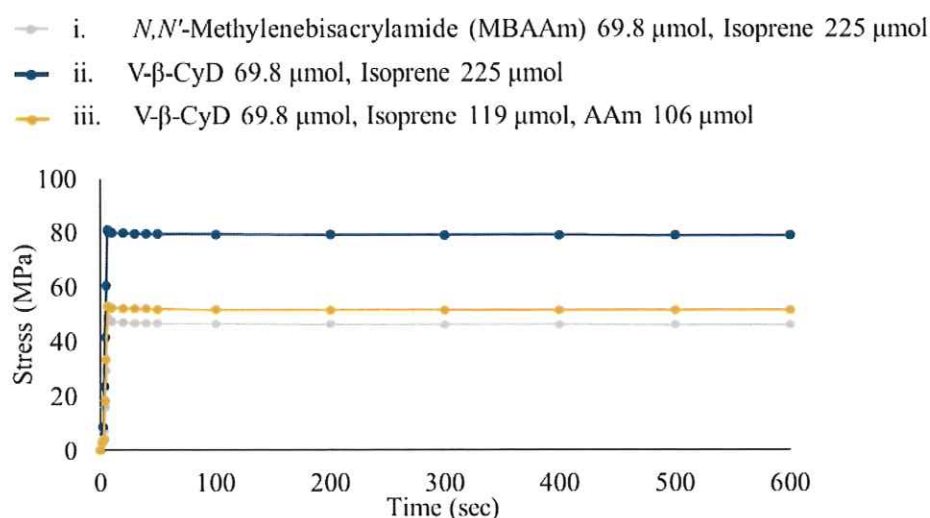


Fig. 33 The change in stress over time.

しかしながら、ひずみを 3 回加えた結果、i および ii では架橋の切断による不可逆的なゲルの崩壊が観察されたのに対し、iii の AAm とイソプレンを共重合したゲルでは、i の化学架橋のゲルより 1 回目の測定時の応力が高く、硬いゲルであったにも関わらず、ひずみを繰り返し加えてもゲルの構造の崩壊は生じなかった (Fig. 34). このことから、AAm の共重合により架橋がスライドし、力学的ストレスに強い SRG が得られたと考えられた.



**Fig. 34** Gel with strain applied 3 times.

## 第 2 節 ビニル基修飾 $\beta$ -CyD と機能性モノマーの共重合による

### スライドラングゲルの調製

刺激応答性の付与には、温度応答性を期待した *N*-イソプロピルアクリルアミド (NIPAAm)<sup>54</sup> と、糖応答性を期待した 4-ビニルフェニルボロン酸 (4-V-PBA)<sup>55</sup> を用いることとした。NIPAAm は、下限臨界共溶温度 (LCST; Lower Critical Solution Temperature) を有しており (Fig. 35), 温度変化によるゲルの膨潤性をコントロールできると期待した。ボロン酸誘導体である 4-V-PBA は、糖などのジオール構造を持つ化合物と可逆的に結合し、負電荷を帯びることが知られており (Fig. 36), 糖尿病に関連する糖センサーや DDS への応用が期待されている<sup>55-57</sup>。またボロン酸誘導体は、細胞表面の糖鎖とも結合することから、再生医療などへの応用も期待されている<sup>58, 59</sup>。

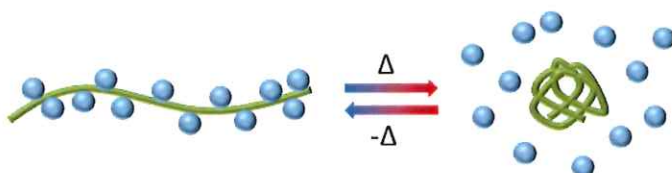


Fig. 35 The nature of poly(NIPAAm) in temperature change.

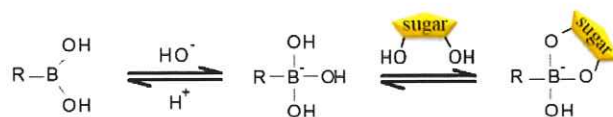
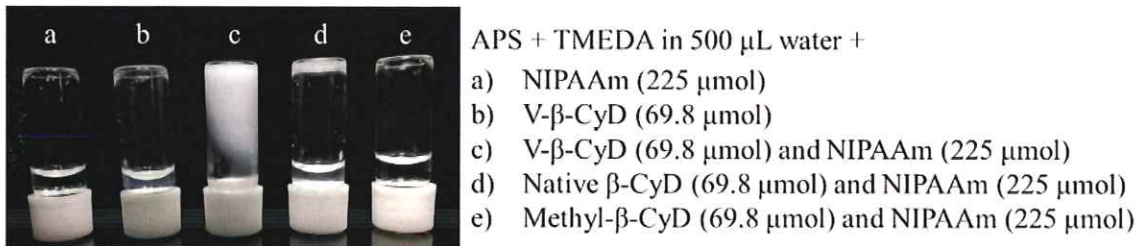


Fig. 36 Boronic acid derivative response to *cis*-diol compounds.

NIPAAm によるゲルは、LCST 以下の温度では親水性を示して膨潤する。一方 LCST 以上の温度では疎水性を示し、ゲルは脱水して収縮する。そこで、NIPAAm と V- $\beta$ -CyD を共重合して SRG の調製を試みたが、イソプレンを用いたゲルと比較して安定した架橋の形成が見られなかった (Fig. 37)。これは、NIPAAm の嵩高さにより  $\beta$ -CyD が通り抜けづらいためであると考えられた。

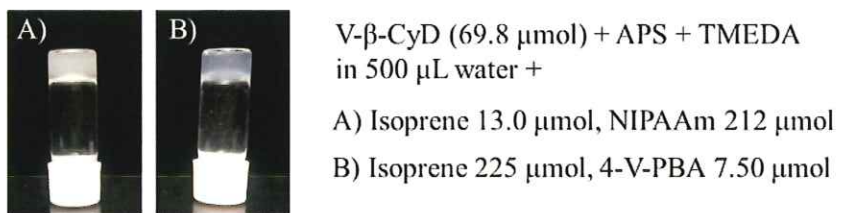


**Fig. 37** Photographs of vials inverted after polymerization.

そこで、NIPAAm を用いた SRG の調製に際して  $\beta$ -CyD を貫通できるイソプレンを共重合し、SRG の調製を試みた。V- $\beta$ -CyD の量は変えずに、イソプレンと NIPAAm のモル比を変え共重合すると、立体を保持できる SRG を調製することができた (Fig. 38 (A))。このことから、NIPAAm のような嵩高いモノマーでも、イソプレンのような  $\beta$ -CyD が通り抜けられるサイズのモノマーと組み合わせることで、安定した架橋が形成され、SRG を得ることができると分かった。

続いて、糖応答性の SRG を調製した。SRG に 4-V-PBA を導入することで、糖の存在下生じた負電荷が溶媒のイオンを引き寄せ、ゲル内部の浸透圧の上昇によりゲルが膨潤すると予想した。

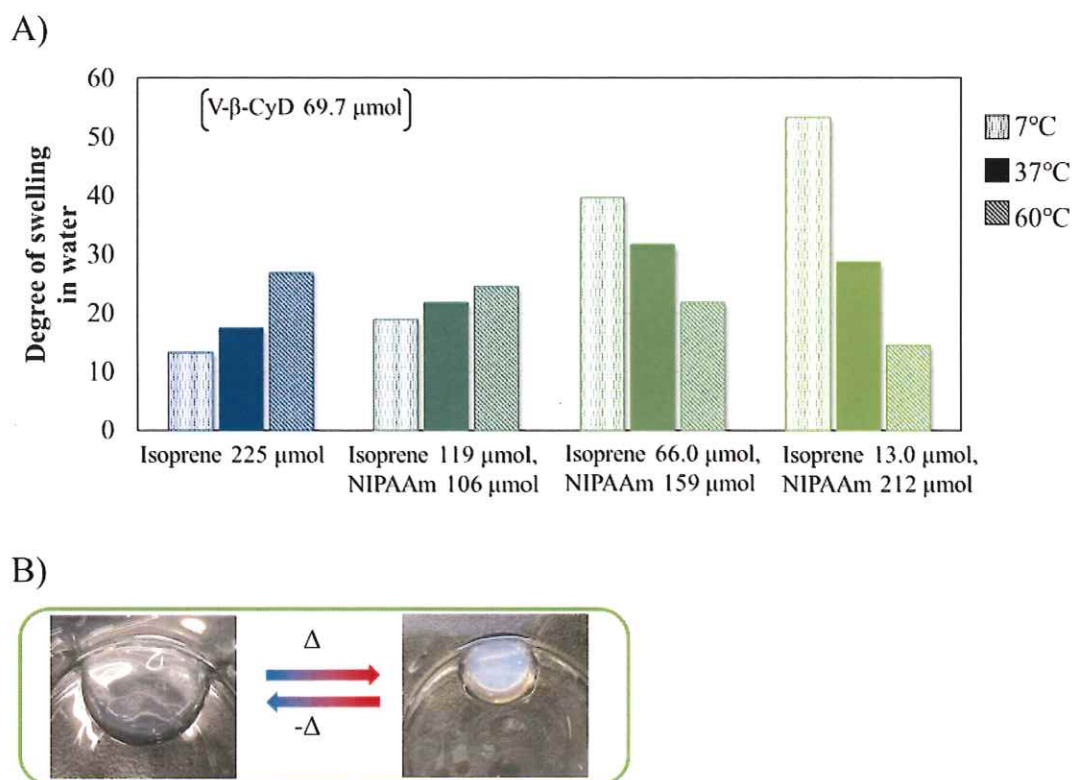
4-V-PBA を導入した SRG は、V- $\beta$ -CyD、イソプレン、そして 4-V-PBA を共重合して調製し、SRG を得た (Fig. 38 (B))。



**Fig. 38** Photographs of vials inverted after polymerization.

### 第 3 節 刺激応答性の検討

NIPAAm と共重合して調製した SRG の、7°C および 60°C における膨潤度を比較してみると、NIPAAm の比率の高い SRG においては、低温下では高く、高温下では低下するという温度による応答が見られた (Fig. 39).



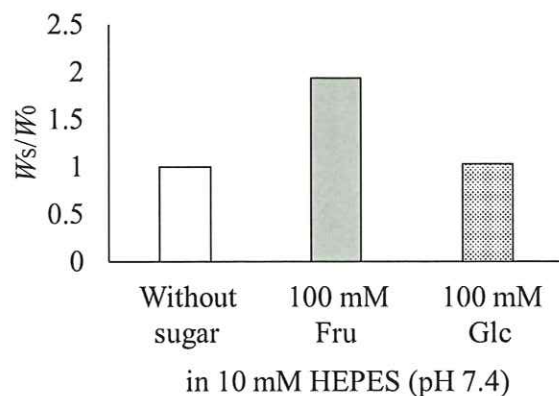
**Fig. 39** Gels composed of V-β-CyD, isoprene and NIPAAm; **A)** swelling degree (7°C, 37°C, 60°C) and **B)** photographs (7°C, 60°C).

この結果から、主鎖の一部に NIPAAm が連続して重合している部分が生じていると考えられた。また、NIPAAm と V-β-CyD のみの共重合では立体を保持できるゲルが得られなかったのに対し、イソプレンを共重合することで立体を保持できるゲルが得られたことから、V-β-CyD がイソプレンを包接して架橋を形

成し, さらに主鎖に共重合した NIPAAm 鎖が, 親水性の向上および温度応答性基として機能することが示された.

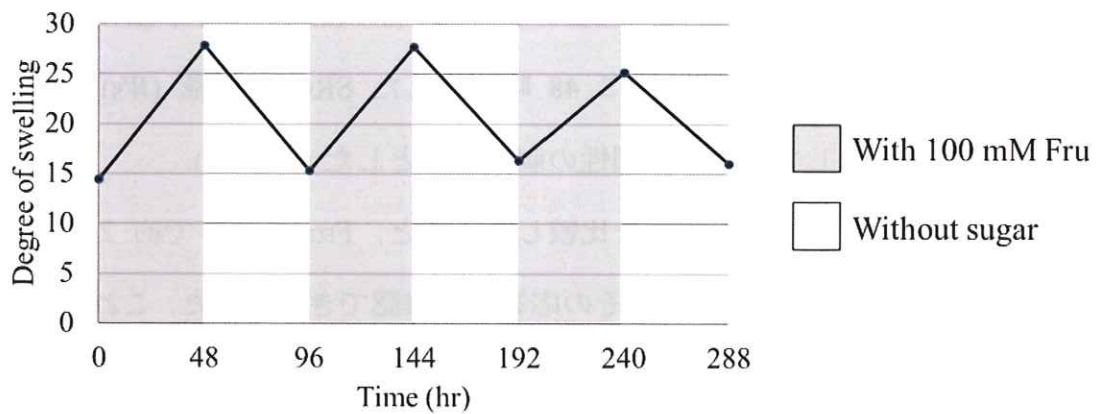
4-V-PBA を導入した SRG の糖応答性は, pH 7.4 の HEPES バッファー中における, フルクトース (Fru) またはグルコース (Glc) 存在時と糖非存在時の質量を比較して観察した. HEPES バッファーに 48 時間浸して平衡に達した SRG の質量 ( $W_0$ ) と, 各種糖溶液に 48 時間浸した SRG の質量 ( $W_s$ ) についてそれらの値を比として表し, 膨潤性の刺激応答とした (Fig. 40).

Fru 存在時と非存在時の膨潤度を比較してみると, Fru の共存で約 2 倍大きく膨潤した. 一方, Glc の共存ではその応答性は確認できなかった. これは, Fru および Glc のフェニルボロン酸 (PBA) との結合定数 ( $M^{-1}$ ) が, 160 および 4.60 と大きく異なることから<sup>60</sup>, この差に由来するものであると考えられた.



**Fig. 40** Sugar response of the gel composed of V- $\beta$ -CyD, isoprene and 4-V-PBA in a buffer solution (10 mM HEPES, pH 7.4).

また 4-V-PBA を含むゲルは, Fru の有無により, 膨潤-収縮の繰り返し応答も示した (Fig. 41). この結果から, SRG の調製に際して 4-V-PBA を導入することで, Fru に応答して膨潤するゲルを得ることが可能になった. Fru 以外にも, 4-V-PBA と結合するシスジオール構造を持つ化合物の存在下では, その結合定数に応じて大きく膨潤する SRG が得られると考えられた.



**Fig. 41** Fru response of the gel composed of V- $\beta$ -CyD, isoprene and 4-V-PBA in the buffer solutions (10 mM HEPES, pH 7.4).



## 第 4 節 小括

AAm とイソプレン, V- $\beta$ -CyD を共重合することにより力学的ストレスに強い SRG が得られた.

V- $\beta$ -CyD を架橋剤として用いた NIPAAm による SRG を得るには, イソプレンと組み合わせることが有効であった. この SRG では, 架橋部位にイソプレンが存在すると考えられた. また 4-V-PBA を共重合した SRG は, Fru の共存により, Fru 非共存下と比較し約 2 倍の膨潤度を示した.

NIPAAm の導入により温度応答性が, 4-V-PBA の導入により糖応答性が確認できたが, 嵩高い刺激応答性基の存在により架橋がスライドする性質は損失してしまうことが予想された. そのため, イソプレンのみならず様々なモノマーを組み合わせることで, スライド機能と刺激応答の両方の機能を保持できる設計が期待できる.

NIPAAm を導入した SRG は, 低温下での薬物放出や高温下での放出抑制といった温度による放出制御が可能である. SRG の調製に際し, 他の温度応答性モノマーを用いることで様々な温度による放出制御が期待できる.

4-V-PBA を導入した SRG では, 糖存在下での高い膨潤性や, 糖鎖をもつ細胞表面での特異的な薬物放出といった放出制御やターゲティングが可能であると期待できる. 本研究で調製したこれらの SRG はワンポットで調製が可能であり, 調製に際して時間やコストを削減でき, 安全な開始剤を用いれば *in vivo* での合成の可能性もあるといったメリットも挙げられる.

さらに, 刺激応答性と架橋がスライドする効果を組み合わせた SRG は, よりダイナミックな刺激応答性を獲得することが可能であると期待できる.

## 総括

DDS の基剤への応用も検討されている合成分子マシンは、その技術が医薬品開発や最先端治療の助けになることが期待されており、様々な分野での研究が行われている。本研究の目的は、高い機能を有する DDS に利用可能な機能性材料として、CyD と共重合体を組み合わせた pPRX もしくは PRX 構造を持つ新規材料の開発であった。

第 1 章では、pPRX の特徴を活用し、CyD とブロック共重合体である BtPPG-PCL を用いた複合粒子の調製と、ゲスト化合物の添加による複合粒子から一次粒子の再生について検討した。複合粒子の調製においては、CyD と BtPPG-PCL による、pPRX 間の相互作用により凝集する複合粒子を調製することができた。また、複合粒子懸濁液に  $\beta$ -CyD のゲスト化合物である NaDC または NaC を添加することにより、pPRX が崩壊して生じる一次粒子の再生が観察できた。これらの複合粒子は、徐放製剤化や腸溶製剤化による放出制御だけでなく、プロドラッグ化による吸収改善も可能になる新たな材料となることが期待できる。

第 2 章では、PRX の特徴を活用し、ビニル基を 1 つ持つ CyD とビニルモノマーを共重合することにより、高分子鎖上に CyD を固定したゲルのワンポットでの調製について検討した。本検討では、V- $\beta$ -CyD とイソプレンの共重合により、ワンポットで  $\beta$ -CyD 固定化ゲルを調製することができた。これにより、一部の V- $\beta$ -CyD が主鎖となるビニルモノマーを包接することで架橋点として機能するという、新しい架橋構造を持つゲルを得ることができた。またゲルには、

イソプレンを包接していないフリーの CyD も多数存在しており、ゲル中に  $\beta$ -CyD を固定化することができた。さらに、ゲルの調製に際して AAm を共重合することで、その膨潤性やフリーの CyD 量をコントロールすることができた。このような CyD を固定したゲルは、新たな放出制御機能を有するのみならず、経口投与などにより治療効果を発揮するゲルとなることも期待できる。

第 3 章では、これまでの SRG の調製においては多数のステップを要するという問題に対して、第 2 章で開発した技術を用いて機能性 SRG をワンポットで調製することを目的とした。イソプレンと V- $\beta$ -CyD に加え、AAm を共重合することで、架橋がスライドし、力学的ストレスに強い SRG が得られた。またスライド機能に加えて刺激応答性の機能を付与できれば、よりダイナミックな応答が期待できると考え、機能性モノマーとイソプレン、V- $\beta$ -CyD を共重合することにより SRG を調製した。機能性モノマーとして NIPPAm を導入した SRG では温度応答性が、4-V-PBA を導入した SRG では糖応答性が確認できた。嵩高い刺激応答性基の存在により架橋がスライドする性質は損失してしまうことが予想されるが、様々なモノマーを組み合わせることで、スライド機能と刺激応答の両方の機能を保持できる設計が期待できる。このような SRG は、放出制御やターゲティングが可能であると期待できる。またこれらの SRG はワンポットで調製が可能であることから、これまでの課題であった多数のステップを要する点を改善でき、時間やコストを削減できるといったメリットも挙げられる。

本研究では、CyD と共重合体を組み合わせることで、上記の新規材料の開発を可能にした。第 2 章で調製した CyD 固定化ゲルと、第 2 章で調製した刺激

応答性 SRG を組み合わせることで、経皮吸収型製剤や埋め込み型製剤への応用も期待できる。また微粒子化した CyD 固定化ゲルを、第 1 章で調製した複合粒子内に取り込ませることで、新たな経口投与製剤や静注用製剤となることも期待できる。さらに、それらにも刺激応答性などの機能を付与することも可能であると考えられる。

このように、CyD と共重合体を組み合わせた分子複合体を活用し、高度な機能を有する DDS 基剤への発展に繋がることが期待できる。

## 謝辞

本研究に際し、主研究指導員としてご指導ご鞭撻を賜りました城西大学薬学研究科薬品物理化学講座教授 関俊暢 先生に深甚なる謝意を表します。研究だけでなく日々の多くの活動をご指導くださり、多くの出会いや学びの機会をいただき、貴重な経験をすることができました。

本研究の遂行にあたり、実験のご指導やご助言を賜り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、城西大学薬学研究科薬品物理化学講座助教授 三木涼太郎 先生に深謝の意を表します。

本論文作成、学位論文審査にあたり、ご教授とご校閲を賜りました城西大学薬学研究科製剤学講座教授 夏目秀視 先生、城西大学薬学研究科医薬品化学講座教授 坂本武史 先生、城西大学薬学研究科生体分析化学講座 古地壯光 先生に深謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、貴重なご助言を賜りました城西大学薬学研究科講座教授 山ノ井孝 先生、帝京大学大学院薬学研究科衛生化学講座教授 荒田洋一郎 先生、城西大学薬学研究科薬品作用学講座教授 岡崎真理 先生に深謝の意を表します。

$^{13}\text{CCP/MAS NMR}$  測定に関してご協力いただきました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、ならびに埼玉大学科学分析支援センター准教授 藤原隆司 先生に感謝の意を表します。

実験の手技や研究の面白さを教えてくださいました山口東京理科大学薬学部薬品製造化学分野講師 田村雅史 先生、博士課程進学にあたり貴重なご助言を賜りました城西大学薬学部薬局管理学研究室助教授 武藤香絵 先生に深謝の意を表します。

また学位取得にあたり，日本薬学会長井記念薬学研究奨励金をいただきましたことを感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり，ご協力を頂きました城西大学薬学研究科を修了された先輩諸氏，城西大学薬学研究科薬品物理化学研究室学生諸子に心より感謝いたします。また，研究を進めるにあたりご協力いただきながら，ここにお名前を記すことができなかつた多くの皆様に感謝申し上げます。

最後に，博士課程へ進学する機会を与えてくれた両親，祖父母に心より感謝いたします。

## 実験の部

### 第 1 章

#### 1. 実験材料

$\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CyD) は、純正化学株式会社 (東京) より購入した。Sodium cholate ( $\geq 98.5\%$ ) と urea, Amberlyst A-21 ion exchange resin は、和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。Poly(propylene glycol) monobutyl ether ( $M_n \sim 2,500$ , BtPPG) と  $\epsilon$ -caprolactone, diphenyl phosphate, sodium deoxycholate ( $\geq 97\%$ ) 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. BtPPG-PCL diblock copolymer (BtPPG-PCL) の合成

Toluene (12.5 mL) に、BtPPG (5 mmol) と DPP (0.2 mmol),  $\epsilon$ -CL (10 mmol) を加え、窒素雰囲気下、 $90^\circ\text{C}$  で 6 時間攪拌した。Amberlyst A-21 ion exchange resin を加えて 30 分攪拌し、反応を停止した。その後、Amberlyst A-21 ion exchange resin を濾過により取り除き、濾液を  $0^\circ\text{C}$  に冷やした hexane 中に滴下した。得られた白色の沈殿を、メンブレンフィルター (PTFE, pore size  $0.5 \mu\text{m}$ ) を用いて回収した。

#### 3. BtPPG-PCL による粒子の調製

15 mL の水を  $0^\circ\text{C}$  に冷やししながら、ホモジナイザー (IKA® T25, digital ULTRA-TURRAX®) を用い激しく攪拌 (10,000 rpm) し、そこに dichloromethane 600  $\mu\text{L}$

に溶解した BtPPG-PCL 1 mg を滴下した。その後、スターラーで攪拌を続けて dichloromethane を蒸発させた。その溶液を 1 mL とり、動的光散乱法にて粒子径を測定した。

#### 4. BtPPG-PCL による複合粒子の調製

1.125 ~ 9 mg/mL の  $\beta$ -CyD 水溶液, 72.5 mg/mL の  $\alpha$ -CyD 水溶液, または 116 mg/mL の  $\gamma$ -CyD 水溶液を用いて, 粒子調製と同様の手順で粒子を調製した。調製した複合粒子は, メンブレンフィルター (PTFE, pore size 0.5  $\mu$ m) を用いて回収した。

#### 5. 尿素添加による複合粒子の崩壊実験

調製した複合粒子の懸濁液を 2 mL とり, そこに尿素水溶液 (4 mol/L) を 2 mL を加え, 尿素が約 2 mol/L となるように調製して攪拌した。その溶液を 1 mL とり, 動的光散乱法にて粒子径を測定した。

#### 6. $^1\text{H-NMR}$ 測定

$^1\text{H-NMR}$  は, 試料を  $\text{DMSO-}d_6$  に溶解し, Varian 400-MR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて測定した。

#### 7. 粒子径測定

粒子径は, 動的光散乱法 (Dynamic light scattering measurements: DLS) にて測定した。測定は, 4 mW, 波長 633 nm の He-Ne レーザーを光源として搭載する, Malvern Zetasizer Nano-S (Malvern Instruments, London, UK) を用いた。検出器はアンバランスフォトダイオードであり, 散乱角  $\theta$  は  $173^\circ$ , 測定温度は  $7^\circ\text{C}$  または



25°Cで行った.

#### 8. 濁度試験

V-530 UV-Vis spectrometer (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) を用いて測定した.

スターラーで攪拌しながら 25°Cの条件下, 波長 700 nm で測定した.

## 第 2 章

### 1. 実験材料

$\beta$ -CyD は、純正化学株式会社 (東京) より購入した。Isoprene (stabilized with 4-tert-butylcatechol: TBC) と dibutyltin dilaurate, 2,6-di-tert-butyl-p-cresol は、東京化成株式会社 (東京) より購入した。Ammonium peroxodisulfate (APS) と 2-isocyanatoethyl methacrylate, *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TMEDA) は、和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。Polyisoprene (99+% trans-1,4) と 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) は、Sigma-Aldrich Japan (東京) より購入した。6-(p-Toluidino)2-naphthalenesulfonic acid (TNS) は、コスモ・バイオ株式会社 (東京) より購入した。Isoprene は蒸留により精製し、重合禁止剤である TBC を取り除いた。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. V- $\beta$ -CyD の合成

$\beta$ -CyD (5.67 g, 5.00 mmol) と dibutyltin dilaurate (95.2  $\mu$ L, 160  $\mu$ mol) を 40 °C の超脱水 DMSO (100 mL) に溶解した。そこに、超脱水 DMSO (30 mL) に溶かした 2-isocyanatoethyl methacrylate (846  $\mu$ L, 6.00 mmol) を滴下し、攪拌した。反応の進行は、シリカゲルを吸着剤に用いた薄層クロマトグラフィー (TLC; Thin Layer Chromatography) により確認した。展開溶媒には、n-butanol/EtOH/water (5/4/3, v/v/v) を用いた。反応開始から 22 時間後、溶媒を減圧濃縮し、acetone (500 mL) に滴下して得られた沈殿を、メンブレンフィルターを用いて回収した。回収した固体は、ポリスチレンゲル (DiaionHP-20, 三菱ケミカル, 東京) と 15% methanol 溶液を用いて精製した。その際、重合禁止剤である 2,6-ditert-butyl-p-cresol を、

約 3 ppm の濃度で添加した。溶媒を減圧濃縮した溶液 (50 mL) を acetone (500 mL) に滴下して 1 置換体のみを回収した。この工程で, 2,6-ditert-butyl-*p*-cresol は acetone に溶解した。得られた白色の沈殿物を, メンブレンフィルターを用いて回収し, 少量の acetone で 3 回洗浄したのちに減圧乾燥した (1.17 g, 20.6%).

### 3. ゲルの調製

V-β-CyD (90.0 mg, 69.8 μmol) と APS (325 μg, 1.50 μmol) を, 水 (500 μL) に溶かして直径 9.75 mm のマイクロプレート (48 well) に入れて窒素バブリングを 20 分行った。そこに Isoprene (22.5 μL, 225 μmol) を加え, 20 分振とう攪拌した。その後, 重合開始剤である TMEDA (1.04 μL, 5.00 μmol) を加えて重合を開始した。24 時間後, 調製したゲルを取り出して 30 mL の水で 12 時間洗浄し, 未反応物を取り除いた。

### 4. 膨潤度試験

水で洗浄したゲルを各種溶液に浸し, 経時的にゲルの質量を測定した。平衡に達したときの質量を膨潤ゲル ( $W_{\text{swollen}}$ ) として記録し, ゲルを別の溶媒に移した。使用した溶媒は, 水, DMF, THF および MeOH であり, この順序で膨潤度を測定した。 $W_{\text{swollen}}$  を測定したのち, ゲルを水に浸して 12 時間ごとに水を換え, 36 時間洗浄した。その後, ゲルを 40°C で 12 時間真空乾燥し, 乾燥ゲルの質量 ( $W_{\text{dry}}$ ) を測定した。膨潤度の値は, ( $W_{\text{swollen}}/W_{\text{dry}}$ ) から算出した。

#### 5. $^1\text{H}$ -NMR 測定

$^1\text{H}$ -NMR は、試料を  $\text{DMSO-}d_6$  または  $\text{D}_2\text{O}$  に溶解し、Varian 400-MR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて測定した。

#### 6. $^{13}\text{C}$ -NMR 測定

$^{13}\text{C}$ -NMR は、Bruker AVANCE500T (Bruker BioSpin K.K., Kanagawa, Japan) を用いて測定した。

#### 7. FAB-MS 測定

FAB-MS は、JMS-700 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) を用いて測定した。

#### 8. 吸光度測定

吸光度は、SpectraMax M5<sup>®</sup> (Molecular Device, CA, USA) を用いて測定した。

## 第 3 章

### 1. 実験材料

$\beta$ -CyD は、純正化学株式会社 (東京) より購入した。Isoprene (stabilized with 4-tert-butylcatechol: TBC) と dibutyltin dilaurate, 2,6-di-tert-butyl-p-cresol, 4-vinylphenylboronic acid (containing varying amounts of anhydride) は、東京化成株式会社 (東京) より購入した。Acrylamide (AAm) と *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) (stabilized with Hydroquinone monomethyl ether), Ammonium peroxodisulfate (APS), 2-isocyanatoethyl methacrylate, *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TMEDA) は、和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。Polyisoprene (99+% trans-1,4) と 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) は、Sigma-Aldrich Japan (東京) より購入した。6-(*p*-Toluidino)2-naphthalenesulfonic acid (TNS) は、コスモ・バイオ株式会社 (東京) より購入した。Isoprene は蒸留により精製し、重合禁止剤である TBC を取り除いた。NIPAAm は Hexane で再結晶を行い、重合禁止剤である Hydroquinone monomethyl ether を取り除いた。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. 温度応答性ゲルの調製

V- $\beta$ -CyD (90.0 mg, 69.8  $\mu$ mol) と APS (325  $\mu$ g, 1.50  $\mu$ mol), 各種 mol 濃度の NIPAAm を水 (500  $\mu$ L) に溶かして直径 9.75 mm のマイクロプレート (48 well) に入れ、窒素バブリングを 20 分行った。そこに各種 mol 濃度の Isoprene を加え、同様の手順でゲルを調製した。

### 3. 糖応答性ゲルの調製

V- $\beta$ -CyD (90.0 mg, 69.8  $\mu$ mol) と APS (325  $\mu$ g, 1.50  $\mu$ mol), 4-vinylphenylboronic acid (1.1 mg, 7.5  $\mu$ mol) を水 (500  $\mu$ L) に溶かして直径 9.75 mm のマイクロプレート (48 well) に入れ, 同様の手順でゲルを調製した.

### 4. 温度応答性試験

水で洗浄したゲルを室温で水に浸しておき, 平衡に達した時点の質量を室温での膨潤度の算出に用いた. それらのゲルを 60°C 下で水に浸し, 同様に質量を測定した. その後それらのゲルを, 7°C 下で水に浸して同様に質量を測定し, 乾燥した. このときの質量を乾燥質量とし, 膨潤度を算出した.

### 5. 糖応答性試験

水で洗浄したゲルをバッファー溶液 (10 mM HEPES, pH 7.4) に 24 時間浸し, その質量を測定した. その後, ゲルを 100 mM Fru を含むバッファー溶液 (10 mM HEPES, pH 7.4) に 48 時間浸し, 質量を測定した. この操作を 3 回繰り返した. 質量を測定した後に, ゲルを水で洗浄して乾燥した. このときの質量を乾燥質量とし, 膨潤度を算出した.

## 参考文献

1. H. Itoh, A. Takahashi, K. Adachi, H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida and K. Kinoshita, Mechanically driven ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase, *Nature*, 427, 465-468 (2004).
2. 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).
3. V. Balzani, A. Credi, F. M. Raymo and J. F. Stoddart, Künstliche molekulare maschinen, *Angew.Chem.*, 112, 3484-3530 (2000).
4. C. P. Collier, E. W. Wong, M. Belohradsky, F. M. Rayomo, J. F. Stoddart, P.J. Kuekes, R. S. Williams and J. R. Heath, Electronically configurable molecular-based logic gates, *Science*, 285, 391-394 (1999).
5. C. P. Collier, G. Mattersteig, E. W. Wong, Y. Luo, K. Beverly, J. Sapaio, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, and J. R. Heath, A [2]catenane-based solid state electronically reconfigurable switch, *Science*, 289, 1172-1175 (2000).
6. Y. Yuan, C. Du, C. Sun, J. Zhu, S. Wu, Y. Zhang, T. Ji, J. Lei, Y. Yang, N. Gao and G. Nie, Chaperonin-GroEL as a smart hydrophobic drug delivery and tumor targeting molecular machine for tumor therapy, *Nano Lett.*, 18 (2), 921-928 (2018).
7. C. J. Collins, B. P. Loren, M. S. Alam, Y. Mondjinou, J. L. Skulsky, C. R. Chaplain, K. Haldar and D. H. Thompson, Pluronic based  $\beta$ -cyclodextrin polyrotaxanes for treatment of Niemann-Pick Type C disease, *Sci. Rep.*, 7, 46737 (2017).
8. A. Tamura and N. Yui, Lysosomal-specific cholesterol reduction by biocleavable polyrotaxanes for ameliorating Niemann-Pick Type C disease, *Sci. Rep.*, 4, 4356 (2014).
9. A. Harada, M. Okada, J. Li and M. Kamachi, Preparation and characterization of inclusion complexes of poly (propylene glycol) with cyclodextrins, *Macromolecules*, 28, 8406-8411 (1995).

10. A. Harada, J. Li, M. Kamachi, Double-stranded inclusion complexes of cyclodextrin threaded on poly(ethylene glycol), *Nature*, 370, 126-128 (1994).
11. C. Alvarez-Lorenzo, C. A. García-González and A. Concheiro, Cyclodextrins as versatile building blocks for regenerative medicine, *J. Control. Release*, 268, 269-281 (2017).
12. H. Arima, K. Motoyama and T. Higashi, Potential use of cyclodextrins as drug carriers and active pharmaceutical ingredients, *Chem. Pharm. Bull.*, 65, 341-348 (2017).
13. P. Jansook, N. Ogawa and T. Loftsson, Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications, *Int. J. Pharm.*, 535, 272-284 (2018).
14. G. Wenz, B. H. Han, and A. Müller, Cyclodextrin rotaxanes and polyrotaxanes, *Chem. Rev.*, 106, 782-817 (2006).
15. A. Harada, A. Hashizume, H. Yamaguchi and Y. Takashima, Polymeric rotaxanes, *Chem. Rev.*, 109, 5974-6023 (2009).
16. A. Harada, J. Li and M. Kamachi, The molecular necklace: a rotaxane containing many threaded  $\alpha$ -cyclodextrins, *Nature*, 356, 325-327 (1992).
17. Y. Akae, T. Arai, Y. Koyama, H. Okamura, K. Johmoto, H. Uekusa, S. Kuwata and T. Takata, One-pot synthesis of permethylated  $\alpha$ -CD-based rotaxanes having alkylene chain axles and their structural characteristics, *Chem. Lett.*, 41, 806-808 (2012).
18. S. Liu, J. Cai, L. Ren, L. Wang and Y. Wang,  $\beta$ -Cyclodextrin polyrotaxane monoaldehyde: a novel bio-crosslinker with high biocompatibility, *RSC Adv.*, 4, 18608-18611 (2014).
19. J. Watanabe, T. Ooya and N. Yui, Preparation and characterization of a polyrotaxane with non-enzymatically hydrolyzable stoppers, *Chem. Lett.*, 27, 1031-1032 (1998).
20. 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).
21. 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/ $\gamma$ CD with propargylamine-substituted  $\beta$ -CDs, *Macromol. Chem. Phys.*, 215, 1022-1029 (2014).
  22. IUPAC. ポリマーに関する術語の基本的定義 1974, *Pure Appl. Chem.*, 40, 477-491 (1974).
  23. G. H. Fredrickson, Block copolymer thermodynamics: theory and experiment, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 41, 525-557 (1990).
  24. K. Kataoka, A. Harada and Y. Nagasaki, Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 37-48 (2012).
  25. 森島洋太郎, 高分子, 46 巻 3 月号, 128-131 (1997).
  26. H. Iguchi, S. Uchida, Y. Koyama and T. Takata, Polyester-containing  $\alpha$ -cyclodextrin-based polyrotaxane: synthesis by living ring-opening polymerization, polypseudorotaxanation, and end-capping using nitrile *N*-oxide, *ACS Macro Lett.*, 2, 527-530 (2013).
  27. 長田義仁・梶原莞爾 編, 普及版ゲルハンドブック, エヌ・ティー・エス, 東京 (1997).
  28. 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).
  29. 大澤 善次郎 著, 入門高分子化学, 裳華房, 東京 (1996).
  30. Y. Okumura and K. Ito, The polyrotaxane gel: a topological gel by figure-of-eight cross-links, *Adv. Mater.*, 13, 485-487 (2001).

31. Y. Noda, Y. Hayashi and K. Ito, From topological gels to sliding materials, *J. Appl. Polym. Sci.*, 131, 1-9 (2014).
32. K. Ito, Slide-ring materials using cyclodextrin, *Chem. Pharm. Bull.*, 65, 326-329 (2017).
33. K. Jang, K. Iijima, Y. Koyama, S. Uchida, S. Asai and T. Takata, Synthesis and properties of rotaxane-cross-linked polymers using a double-stranded  $\gamma$ -CD-based inclusion complex as a supramolecular cross-linker, *Polymer*, 128, 379 (2017).
34. R. K. McMullan, W. Saenger, J. Fayos and D. Mootz, Topography of cyclodextrin inclusion complexes: Part I. Classification of crystallographic data of  $\alpha$ -cyclodextrin inclusion complexes, *Carbohydrate Research*, 31, 37-46 (1973).
35. K. Makiguchi, T. Satoh and T. Kakuchi, Diphenyl phosphate as an efficient cationic organocatalyst for controlled/living ring-opening polymerization of  $\delta$ -valerolactone and  $\epsilon$ -caprolactone, *Macromolecules*, 44 (7), 1999-2005 (2011).
36. W. Deng, H. Yamaguchi, Y. Takashima and A. Harada, A chemical-responsive supramolecular hydrogel from modified cyclodextrins, *Angew. Chem.*, 119, 5236-5239 (2007).
37. X. Tan and S. Lindenbaum, Studies on complexation between  $\beta$ -cyclodextrin and bile salts, *Int. J. Pharm.*, 74, 127-135 (1991).
38. K. Miyajima, M. Yokoi, H. Komatsu and M. Nakagaki, Interaction of  $\beta$ -cyclodextrin with bile salts in aqueous solutions, *Chem. Pharm. Bull.*, 34, (3), 1395-1398 (1986).
39. Z. J. Tan, X. X. Zhu, X and G. R. Brown, Formation of inclusion complexes of cyclodextrins with bile salt anions as determined by NMR titration studies, *Langmuir*, 10, 1034-1039 (1994).
40. B. K. Paul, N. Ghosh and S. Mukherjee, Direct insight into the nonclassical hydrophobic effect in bile salt:  $\beta$ -cyclodextrin interaction: role of hydrophobicity in

- governing the prototropism of a biological photosensitizer, *RSC Adv.*, 6, 9984-9993 (2016).
41. P. R. Cabrer, E. Alvarez-Parrilla, F. Meijide, J. A. Seijas, E. R. Nuñez and J. V. Tato, Complexation of sodium cholate and sodium deoxycholate by  $\alpha$ -cyclodextrin and derivatives, *Langmuir*, 15, 5489-5495 (1999).
  42. X. Tan and S. Lindenbaum, Studies on complexation between  $\beta$ -cyclodextrin and bile salts, *Int. J. Pharm.*, 74, 127-135 (1991).
  43. G. Kali, H. Eisenbarth and G. Wenz, One pot synthesis of a polyisoprene polyrotaxane and conversion to a slide-ring gel, *Macromol. Rapid Commun.*, 37, 67-72 (2016).
  44. J. Hilschmann, G. Kali and G. Wenz, Rotaxanation of polyisoprene to render it soluble in water, *Macromolecules*, 50, 1312-1318 (2017).
  45. J. Hilschmann, G. Wenz and G. Kali, One-pot synthesis of blockcopolyrotaxanes through controlled rotaxa-polymerization, *Beilstein J. Org. Chem.*, 13, 1310-1315 (2017).
  46. T. Michishita, Y. Takashima and A. Harada, Complex formation between polyisoprene and cyclodextrins. *Macromol. Rapid Commun.*, 25, 1159-1162 (2004).
  47. R. Joseph, S. Zhang and W. T. Ford, Structure and dynamics of a colloidal silica-poly(methyl methacrylate) composite by  $^{13}\text{C}$  and  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR spectroscopy, *Macromolecules*, 29, 1305-1312 (1996).
  48. F. H. Larsen, T. Rasmussen, W. B. Pedersen, N. C. Nielsen and H. J. Jakobsen, Observation of immobile regions in natural rubber at ambient temperature by solid-state  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectroscopy, *Polymer*, 40, 7013-7017 (1999).
  49. T. Michishita, Y. Takashima and A. Harada, Complex formation between polyisoprene and cyclodextrins, *Macromol. Rapid Commun.*, 25, 1159-1162 (2004).

50. G. Wenz, Inclusion of adamantan derivatives, *Macromol. Rapid Commun.*, 17, 731-736 (1996).
51. A. Ito, T. Ooya and N. Yui, Preparation of polypseudorotaxane consisting of fluorescent molecule-modified  $\beta$ -cyclodextrins and biotin-terminated poly(propylene glycol) with high yield, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 57, 233-236 (2007).
52. M. Weickerirneier and G. Wenz, Cyclodextrin sidechain polyesters-synthesis and inclusion of adamantan derivatives, *Mtrcrorirol. Rcrpicl Conirirrrri.*, 17, 731-736 (1996).
53. D. Pham, P. Clements, C. J. Easton, J. Papageorgiou, B. L. Maya and S. F. Lincoln, Complexation of 6-(40-(toluidinyl)naphthalene-2-sulfonate) by  $\beta$ -cyclodextrin an-linked  $\beta$ -cyclodextrin dimers, *New J. Chem.*, 32, 712-718 (2008).
54. J. Zhang and N. A. Peppas, Synthesis and characterization of pH- and temperature-sensitive poly(methacrylic acid)/poly(*N*-isopropylacrylamide) interpenetrating polymeric networks, *Macromolecules*, 33, 102-107 (2000).
55. V. Ravaine, C. Ancla and B. Catargi, Chemically controlled closedloop insulin delivery, *J. Control. Release*, 132, 2-11 (2008).
56. T. Seki, K. Abe, K. Nakamura, Y. Egawa, R. Miki, K. Juni and T. Seki, Sugar-responsive pseudopolyrotaxanes and their application in sugar-induced release of PEGylated insulin, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 82, 417-424 (2015).
57. T. Seki, K. Abe, Y. Egawa, R. Miki, K. Juni and T. Seki, A pseudopolyrotaxane for glucose-responsive insulin release: the effect of binding ability and spatial arrangement of phenylboronic acid group, *Mol. Pharm.*, 13, 3807-3815 (2016).
58. A. Matsumoto, N. Sato, K. Kataoka and Y. Miyahara, Noninvasive sialic acid detection at cell membrane by using phenylboronic acid modified self-assembled monolayer gold electrode, *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (34), 12022-12023 (2009).

59. S. Deshayes, H. Cabral, T. Ishii, Y. Miura, S. Kobayashi, T. Yamashita, A. Matsumoto, Y. Miyahara, N. Nishiyama and K. Kataoka, Phenylboronic acid-installed polymeric micelles for targeting sialylated epitopes in solid tumors, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 15501-15507 (2013)
60. G. Springsteen and B. Wang, A detailed examination of boronic acid-diol complexation, *Tetrahedron.*, 58, 5291-5300 (2002).

