

アミノ酸系高分子を基盤とするスマートゲル材料の開発

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

古賀 智之

Fabricating robust shape-fix/memory hydrogels that respond to external stimuli is an important challenge in facilitating gel technology for versatile applications. In this study, we constructed novel multi-stimuli-controllable shape memory hydrogel systems from amino acid-derived vinyl polymer networks. Amino acid-derived vinyl polymers are attractive thermo-responsive materials that are easily synthesized from renewable bio-sources and are biocompatible. Upper critical solution temperature-type poly (*N*-acryloyl glycineamide) (PNAGAm) is selected in this study, as it exhibits good biocompatibility, non-toxicity to cells, and strong and reversible hydrogen bonding. By introducing cysteine-derived disulfide bonds into the PNAGAm matrix, Au-nanorod could be conjugated stably into the hydrogel, resulting in a temperature/light dual-responsive shape memory hydrogel. Furthermore, temperature/pH-dual responsive hydrogel was successfully fabricated by radical copolymerization of NAGAm with *N*-acryloyl aspartic acid (NAD). The hydrogel properties, including stimuli-responsive, mechanical, and shape fix/memory behaviors, were comprehensively investigated. Integrating multiple smart functions into a single hydrogel can meet the requirements for various industrial, biomedical, and cosmetic applications.

1. 緒 言

水を担持した高分子の三次元ネットワークからなるハイドロゲルは、工学、医用、コスメティック材料として幅広い分野で応用されている。架橋点構造を含む構成分子の種類や分子間の複雑な相互作用によりゲル特性が変化し、生体組織に類似した柔軟な粘弾性や生体適合性、物質内包性を示す。近年、ハイドロゲルの高機能化が飛躍的に進んでおり、自己修復性ゲル、高強度ハイドロゲル、インジェクタブルゲルなど多彩なスマートゲルが開発されている¹⁻³⁾。中でも、初期の形状を記憶し、外部刺激に応答して形状変形(固定)、形状回復を示す形状記憶性ゲルは、薬物徐放や細胞足場材料などの医用応用だけでなく、コスメティック材料としても興味深い。一般的に、ゲルネットワークを形成する高分子主鎖と架橋点の少なくともいずれかに、可逆的かつ一時的な相互作用を導入する必要がある。1995年に疎水性アルキル側鎖の熱可逆的な結晶化を利用した形状記憶ゲルが報告されて以来⁴⁾、光/pH/温度/酸化還元等の変化に可逆的に応答する様々な形状記憶ゲルの開発が進められてきた^{5,6)}。しかし、ハイドロゲルの特徴(利点)である高い含水性/透明性と形状固定/記憶能のトレードオフ関係をいかに両立させるかといった課題もある。また、近年SDGsの観点から、こうしたスマートゲル素材についても、環境や生態系への負荷が低く、持続可能な生産がで

きる環境調和型素材への変換が望まれている。

本研究では、ハイドロゲルのもつ優位性(柔軟性/透明性/物質内包性など)を維持しながら、異なる刺激に独立して応答して形状を自在に変形/固定でき、さらなる刺激に応答して記憶した形状に回復できるユニークな性質の新しいスマートゲル材料の開発を進めた。このような高分子ゲルシステムを設計するにあたり、我々はアミノ酸のポテンシャルに着目した。アミノ酸を利用する特徴は、(1)多様な構造(標準アミノ酸で20種)およびそれに基づく機能デザインが容易、(2)再生可能資源である、(3)環境適合性・生分解性に優れることが挙げられる。また、アミノ酸の「構造多様性」と「類似性」という一見相反するような特徴も材料設計には都合がよい。側鎖構造に基づいて、親水性/疎水性/イオン性/水素結合性など様々な性質を呈する(多様性)一方、基本骨格が同じため(類似性)、同一の化学合成戦略でビニルモノマー化でき、通常のラジカル重合やリビングラジカル重合を適用して精密に高分子化できる。複数種を共重合すれば、構造/機能のチューニングも容易である。事実、我々は種々のアミノ酸ビニルモノマーのライブラリーを構築し、アミノ酸種や末端基構造、モノマー配列などに基づいて温度応答挙動(下限臨界溶液温度(LCST)型や上限臨界溶液温度(UCST)型)や転移温度を精密に制御できることを見出している^{7,8)}。このような背景とこれまでの知見をもとに、具体的にはUCST型アミノ酸系高分子を基盤とする多重刺激応答型の形状固定/記憶性スマートハイドロゲルの創出とその構造最適化、ゲル物性/機能評価、生体親和性評価を総合的に行った。新しいバイオ/コスメティック材料となることを期待した。



Development of Smart Hydrogels from Amino-Acid-based Polymers

Tomoyuki Koga

Department of Molecular Chemistry & Biochemistry, Faculty of Science & Engineering, Doshisha University

2. 方 法

2. 1. 各種アミノ酸由来ビニルモノマーの合成

本研究で用いた *N*-アクリロイルグリシンアミド (NAGAm), *N*-アクリロイルアスパラギン酸 (NAD), *N*-アクリロイルシスチン (NAC), *N*-アクリロイルシスチンジメチルエステル (NACMe) は、液相中で対応する各アミノ酸のアミノ基と塩化アクリロイルを縮合させることにより合成した。

2. 2. P (NAGAm/NAC (Me)) ハイドロゲルの調製

NAGAm と NAC (または NACMe) を過硫酸アンモニウム (APS) を開始剤に用いて (1wt%) 水中でラジカル重合させることでハイドロゲルを調製した。厚さ 0.5mm または 1mm のシリコンゴムスパーサーを用いたガラス板 (疎水処理) 中もしくは直径 4mm のシリコンチューブ中、70℃ で 1 時間重合した後、4℃ の超純水でよく洗浄することで目的のハイドロゲルを得た。尚、P (NAGAm/NACMe) ハイドロゲルについては、NACMe が水に不溶であったため、少量の DMSO に溶解させて調製した。ここではモノマー濃度 (xM) や架橋率 (y%) を変えて調製したハイドロゲルを xM/y% と表記する。

2. 3. P (NAGAm/NAC-AuNR) ハイドロゲルの調製

金ナノロッド (AuNR) は、シーディング法を用いて調製した。Seed 溶液は臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB 0.273g) 水溶液 7.5mL と四塩化金 (III) 酸・四水和物 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1mg) 水溶液 0.25mL を混合させ、この溶液に氷浴下で調製した水素化ホウ素ナトリウム (2mg) 水溶液 0.25mL を加え、28℃ において 2 時間静置させることで調製した。Growth 溶液は CTAB (0.519g) 水溶液 14.25mL と $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2.5mg) 水溶液 0.25mL を混合させ、この溶液に硝酸銀 (0.2mg) 水溶液 0.25mL と L-アスコルビン酸 (1.7mg) 水溶液 96μL を加え、10 分間攪拌させることで調製した。AuNR 溶液は Growth 溶液に Seed 溶液 63μL を加え、28℃ において 24 時間静置させて調製した。遠心分離を行い、上澄み溶液 (75%) を取り除き、同量の超純水を加えた。この操作を繰り返し、AuNR 水分散液を得た。AuNR 含有ハイドロゲルの調製は、上述のゲル調製法と同様の手法で、上記 AuNR 水分散液を用いることで行った。

2. 4. P (NAGAm/NAD) ハイドロゲルの調製

NAGAm, NAD および APS を蒸留水にモノマー濃度が 1M となるように溶解させ、全量を 1mL とした。このモ

ノマー溶液を試験管中で N_2 雰囲気中 70℃ で 1 時間重合を行った。その後、分画分子量 1000Da の透析チューブを用いて透析を行い、凍結乾燥により目的のポリマーを得た。所定量のポリマーに蒸留水 (1mL) を加えて 90℃ に加熱して溶解させ、厚さ 1mm のシリコンゴムスパーサーを用いたガラス板 (疎水処理) 中に流し込んだ後、4℃ まで冷却することでシート状のハイドロゲルを調製した。その後、4℃ の超純水でよく洗浄した。

2. 5. 力学特性評価

動的粘弾性測定は TA-Instruments 社製 Discover HR-1 を用いて行った。直径 20mm の平行プレートを用いた。プレートステージギャップ間は、プレートとサンプルが密着するように調整した。周波数依存性はひずみ 1% 一定で、周波数 0.1–100rad/s に変化させ、貯蔵弾性率 G' (Pa) および損失弾性率 G'' (Pa) を測定した。引張り試験はロードセルに 50N、試験治具にねじ式平面形つかみ具を備えた島津製 EZ Graph を用い、引張り速度 1mm/s の条件で行った。試験片 (0.5mm 厚) は、高分子計器製の試験片打抜刃 7 号形ダンベル状 (JIS K 6251-7) を用いて作成した。なお、各サンプルにつき 3 回の引張り試験を同条件で行い試験結果を比較した。

2. 6. 形状固定/記憶性評価

温度変化による評価は、ひも状 (ロッド状) のハイドロゲル ($\theta_0=180^\circ$) を 70℃ (もしくは 50℃) の水中で半分に折り曲げ、4℃ の水中で 1 時間形状を固定した。固定する力を取り除き、維持した角度 (θ_d) を測定し、次式から形状固定率 F を算出した。その後所定の温度の水中に 1 時間浸漬させ、形状が回復した角度 (θ_r) を測定し、以下の式から形状回復率 R を算出した。pH 変化による評価は、まず、pH12.0 の水溶液 (4℃) に 1 時間浸漬させ、その後、ゲルを半分に折り曲げ固定した。この状態で、pH2.0 の水溶液 (4℃) に 1 時間浸漬させて形状固定した。その後、 θ_d を測定した。再び pH12.0 の蒸留水 (4℃) に 1 時間浸漬させたときの θ_r を測定した。

$$\text{Shape fixing percentage } (F) (\%) = (\theta_0 - \theta_d) / \theta_0 \times 100$$

$$\text{Shape recovery percentage } (R) (\%) = \theta_r / \theta_0 \times 100$$

2. 7. P (NAGAm/NAD) ゲルのイオン性物質取り込み実験

P (NAGAm/NAD) ゲル (NAD=0.1) を、直径 1.4cm の円形にくり抜いた。そのゲルを 1mM EosinY 水溶液 (アニオン性) または 1mM RhB 水溶液 (カチオン性) 10mL (pH7.4, 室温 (約 25℃)) に 24 時間浸漬させた。その後、ゲルを水溶液から取り出し、表面に付着した溶液をふき取った後、ゲルを PBS 緩衝溶液 (pH7.4, 室温 (約 25℃))

10mLに24時間浸漬させ、同様の操作を行い、その変化を観察した。

3. 結果と考察

3.1. 温度/光に二重応答する形状記憶ハイドロゲルの開発⁹⁾

UCST型アミノ酸由来ビニルポリマーであるPNAGAmを、汎用の架橋剤であるメチレンビスアクリルアミド(MBA)で化学架橋したハイドロゲルが高い力学強度をもちつつ、温度に応答した可逆的水素結合形成に基づいて形状固定/記憶挙動を示すことを報告した¹⁰⁾。温度と光に二重応答するゲルの開発を目的に、機能的架橋点としてジスルフィド結合を有するL-シスチン由来のジビニルモノマーからなるハイドロゲルを調製した(図1A)。

ジスルフィド結合は酸化還元活性であり、また、AuNRに配位するため、AuNRのフォトサーマル効果を利用した形状記憶機能の発現を期待した。末端にカルボキシ基をもつ親水的なNAC(またはメチルエステル化されたNACMe)を用い、引張っても容易に破断せず、また結ぶこともできるなど、丈夫で透明なハイドロゲルを得た(図1B)。P(NAGAm/NAC)およびP(NAGAm/NACMe)ゲル(1M/1%)の温度応答性(pH4.9)について膨潤率変化から検討したところ、いずれも熱可逆的に低温(4℃)で収縮し、高温(70℃)で膨潤するUCST型の温度応答性を示した(図2A)。ただし、膨潤率はNAC架橋型の方が相対的に高く、繰り返しの温度変化で若干増加した。これは、NAC架橋剤の末端構造に起因しており、イオン化したカルボキシ基の静電反発により、低温での収縮が抑制さ

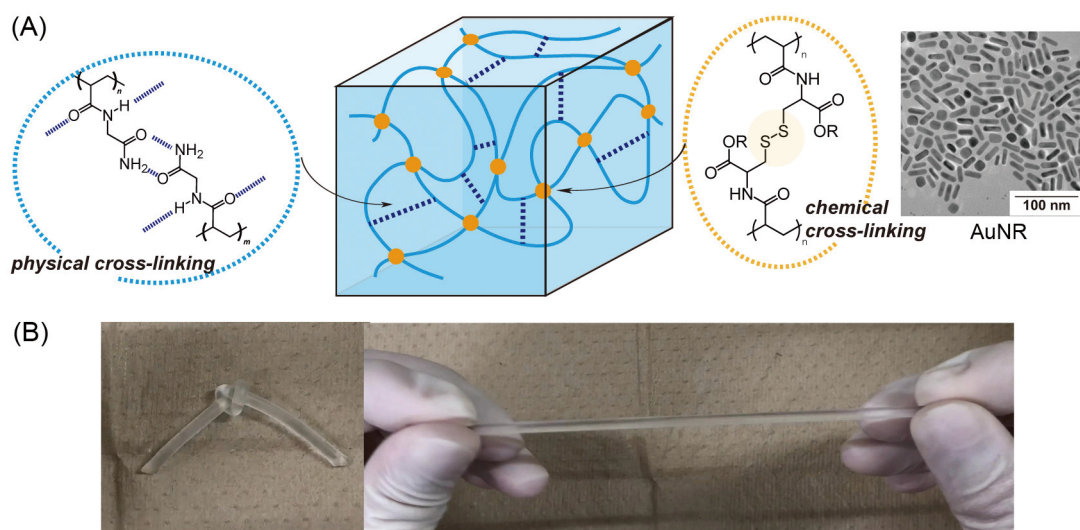


図1 (A) 金ナノロッド (AuNR) とハイブリッド化させた温度/光二重応答性形状固定/記憶性ハイドロゲル (R=H (NAC), CH₃ (NACMe)). (B) P (NAGAm/NAC) ハイドロゲルの写真。

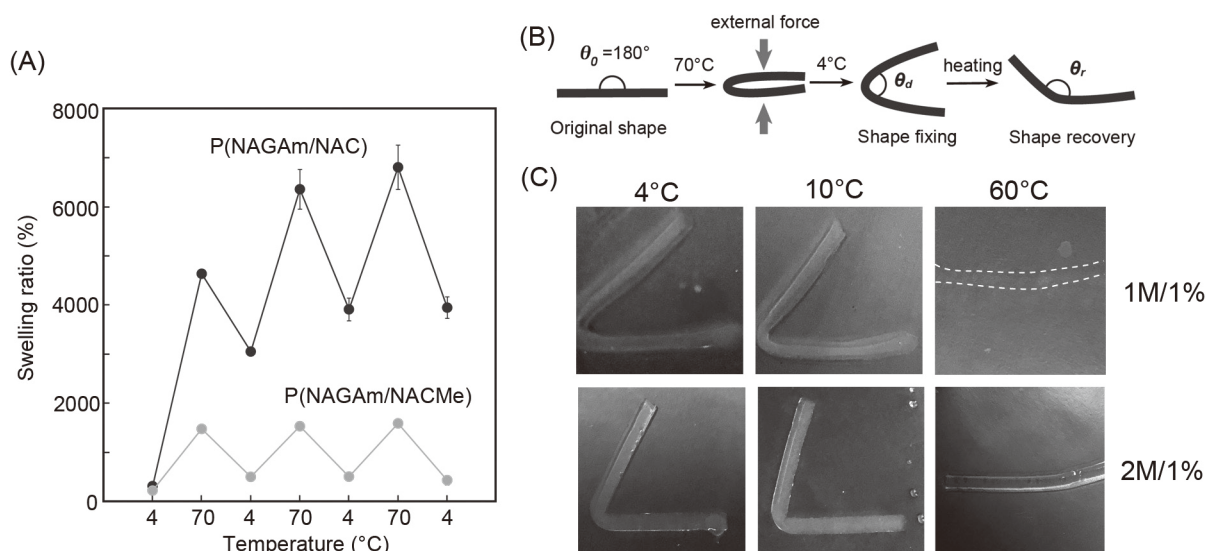


図2 (A) P (NAGAm/NAC) およびP (NAGAm/NACMe) ハイドロゲル (1M/1%) の水中での温度に応答した膨潤-収縮挙動. (B, C) 温度変化を利用したP (NAGAm/NAC) ゲルの形状固定/記憶特性.

れるためである。架橋剤の構造のわずかな違いもゲル特性に反映されることを意味している。これらのゲルはこうした温度応答性に基づき形状固定/記憶性を示した。70℃でPNAGAm間の水素結合を一部解消して形状を変形させた後、4℃で水素結合を再形成させることで、形状を固定でき、再び温度を上昇させていくと元の形状に回復した(図2B, C)。形状固定率 F はP(NAGAm/NAC)ゲル(1M/1%)で76%, 形状回復率 R はほぼ100%であった。P(NAGAm/NACMe)ゲル(1M/1%)は $F=72\%$, $R=ca.100\%$ であることがわかった。モノマー増度の増加(2M/1%)はゲルの弾性率の増加を引き起こし、わずかに形状固定率が低下した($F=63\%$ (NAC型), 61% (NACMe型))。しかしながら、いずれのゲルも良好な温度駆動型の形状固定/記憶ゲルとして機能することがわかった。

次にAuNR(平均サイズ30nm×9nm, $\lambda_{max}=735nm$)と複合させたハイブリッドゲルを調製した。動的粘弾性を評価したところ、P(NAGAm/NAC-AuNR)ゲルは、P(NAGAm/NAC)ゲルに比べて貯蔵弾性率(G' 値)が5倍

程度大きくなった(図3A)。また、引張試験から見積もった破断エネルギーも約2.3倍高くなった。これは、AuNRがジスルフィド結合に配位したことで新たな架橋点が生じ、ポリマーネットワークがより密となったためであると推察される。事実、P(NAGAm/NAC-AuNR)ゲルもUCST型の膨潤-収縮挙動を示すものの、その変化量はAuNRフリーのP(NAGAm/NAC)ゲルの場合に比べてかなり抑制された。

次に、AuNRのフォトサーマル効果に基づく光駆動形状記憶挙動について検討した(図3B)。厚さ1mmの短冊状P(NAGAm/NAC-AuNR)ゲル(2M/1%)(元の形状)を70℃の水中で変形させ、4℃でらせん形状に固定した。キセノンランプ($\lambda=400-1000nm$)を使用して4℃(空气中)の一定温度のインキュベーター内で可視光照射したところ、明確な形状回復が誘発されることがわかった。一方、AuNRフリーのゲルの一時的な形状は光照射によって変化せずに保持された。すなわち、ハイドロゲルマトリックス内のAuNRが光エネルギーを熱に変換し、周囲の水素結合を部分的に破壊したことを示している。尚、この条件下では元の形状に完全に回復していないが、形状回復は局所的な領域ではなくゲル全体で発生していることがわかる。これはP(NAGAm/NAC)ハイドロゲル内にAuNRが均一に分布していることを示している。

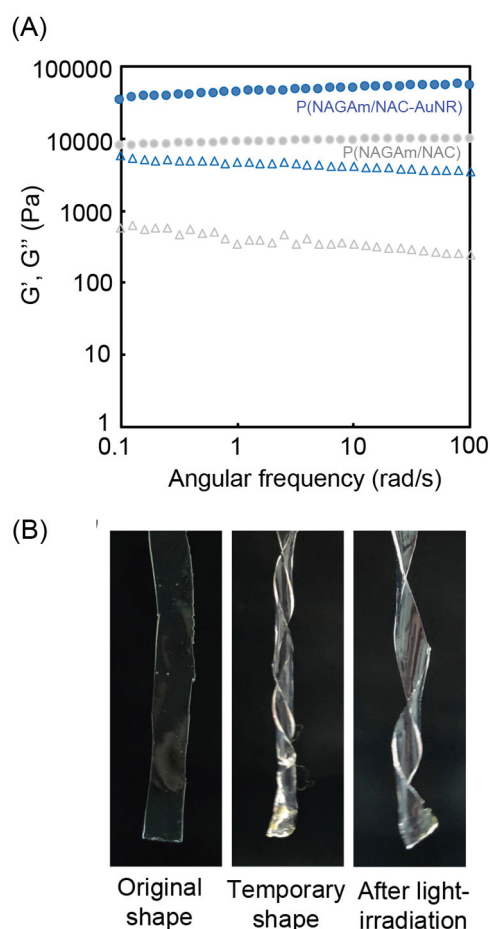


図3 (A) P(NAGAm/NAC) および P(NAGAm/NAC-AuNR) ハイドロゲル(1M/1%)の4℃での粘弾性(○: G' , △: G'')。 (B) P(NAGAm/NAC-AuNR) ハイドロゲルの光による形状回復。

3. 2. 温度/pHに二重応答する形状記憶ハイドロゲルの開発

pH応答性かつUCST型(酸性条件下)のカルボキシ基を有するアスパラギン酸(NAD)残基をコモノマーとして導入したPNAGAmコポリマー(NAD導入率10%, 20%)を調製した(図4A)。PNAGAmは側鎖の2つのアミド基に基づく高い水素結合性を有しており、高濃度条件(>2wt%)では物理ゲルを形成する¹¹⁾。化学架橋剤を用いない場合、高温(約90℃)でゾル化するため、任意の型に流し込んで冷却することでゲルの成形を容易に行うことができる。

P(NAGAm/NAD)(NAD=0.1, 0.2)(1M)から、高い透明性と十分な強度を有するハイドロゲルを調製できた。これらはいずれもpHと温度の多重刺激に応答した膨潤-収縮挙動を示すことがわかった。カルボキシ基がプロトン化する酸性条件(pH2.0)において、可逆的な水素結合形成に由来するUCST型の温度応答(低温で収縮、高温で膨潤)が確認できた。膨潤率の変化量はNAD含有量にほとんど依存しなかった。一方、pH応答性はコポリマー組成に強く依存した。温度一定(4℃)の条件でpH2とpH12の水溶液にゲルを交互に浸漬させると、pH12で膨潤挙動を、pH2で収縮挙動を可逆的に示した。その際の膨潤率の変化量は、NAD=0.1に比べてNAD=0.2の場合で、2倍ほど大きくなった。NADユニットのイオン化による静

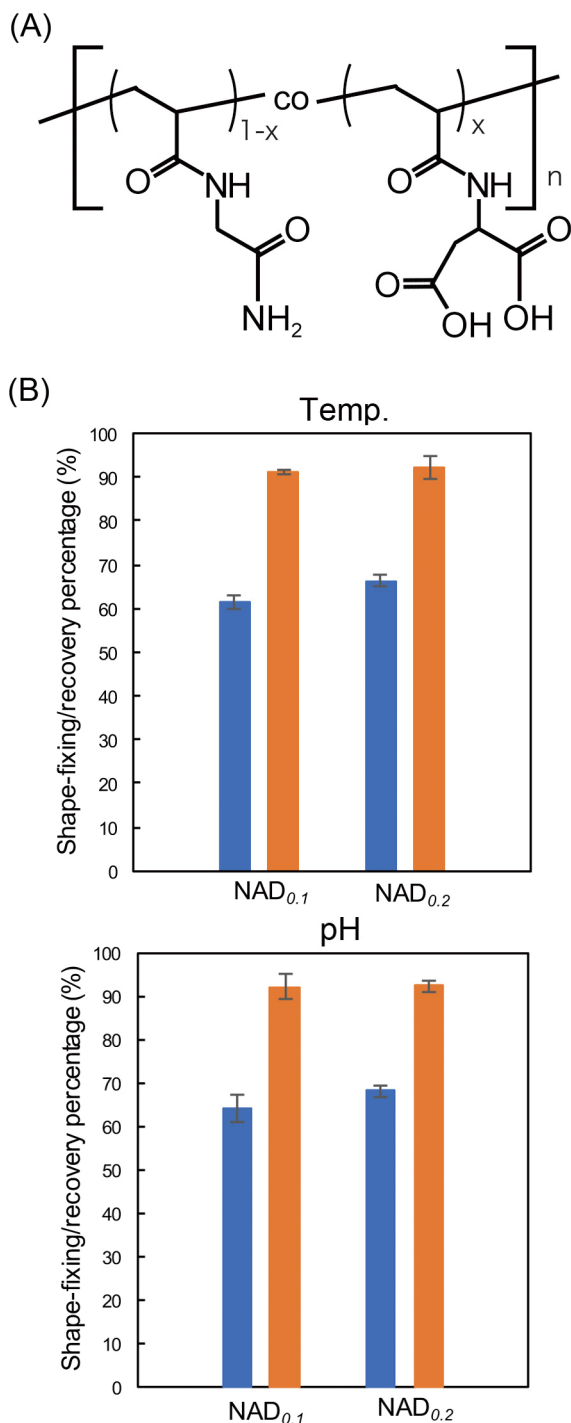


図4 (A) P (NAGAm/NAD) の分子構造. (B) 温度変化および pH 変化を利用した P (NAGAm/NAD) ゲルの形状固定/記憶特性 (青: 形状固定率 (F), オレンジ: 形状回復率 (R))

電反発の大きさを反映している。尚、膨潤-収縮に伴ってゲルの粘弾性も可逆的に変化した。

これらのゲルは温度変化と pH 変化に応答して良好な形状固定/記憶性を示した (図 4B)。上述の化学架橋型 PNAGAm ゲルと同様に温度変化 (pH 2.0 一定, 50℃ (変形) - 4℃ (固定) - 50℃ (回復)) に対しては、形状固定率と回復率はそれぞれ $F=60-65\%$, $R>90\%$ であった。一

方で、温度一定 (4℃) で pH 変化 (pH 12 (変形) - pH 2 (固定) - pH 12 (回復)) によっても形状記憶性を示し、 F 値と R 値はそれぞれ約 65-70% および 約 95% となり、高い形状記憶性が確認された。また、pH 変化によるカルボン酸ユニット間の架橋点の再形成部位が多くなる NAD_{0.2} ゲルは若干高い形状固定性を示した。以上より P (NAGAm/NAD) ハイドロゲルが pH/温度に二重応答し、形状記憶性を示すことが明らかになった。

PNAGAm ゲルはマウス胎児由来 NIH3T3 細胞に対する細胞毒性を示さなかった。また、マウスマクロファージ様細胞 (RAW 264.7) を用いた NO Assay より細胞刺激性を評価したところ、細胞に刺激を与えるリポ多糖 (LPS) の NO 産生量と比べて著しく低い値を示し、細胞に刺激を与えないこともわかった。PNAGAm ゲルが医用材料やコスメティック材料として有望であることを示している。

次に P (NAGAm/NAD) ハイドロゲルの物質内包性/徐放性について評価した。アニオン性の NAD ユニットの考慮して、薬物モデルとして EosinY (アニオン性) および RhB (カチオン性) を採用した。図 5 に P (NAGAm/NAD) ハイドロゲル (pH 7.4) を 1mM EosinY 水溶液または 1mM RhB 水溶液 (pH 7.4) に 24 時間浸漬させた時の形状変形を示した。アニオン性の EosinY の場合ではゲスト分子の取り込みに伴う静電反発の増大によりゲルが若干膨潤 (158%) するのに対して、カチオン性 RhB の場合ではイオンコンプレックス形成に伴って著しいゲルの収縮 (11%) が認められ、RhB が効率的に内包されることがわかる。このゲルを PBS 緩衝溶液 (pH 7.4) に 24 時間浸漬させると、RhB が徐放され元の形状に回復 (92%) することがわかった。導入するイオン性ユニットの設計は、形状記憶機能に多重応答性をもたらすだけでなく物質内包特性の精密制御に繋がる。現在、組成の異なるゲルを用いて、より詳細な構造-機能 (特性) の相関性を検討している。

4. 総括

本研究では、環境調和型素材であるアミノ酸を活用したスマート高分子ゲルシステムの開発を進めた。温度と光、温度と pH の 2 つの刺激に独立して応答するユニットを組み込むことで多重刺激応答型の形状固定/記憶性ハイドロゲル材料の開発に成功した。多様で複雑な環境/状況でのゲル使用に適応できる。近年、環境に及ぼす高分子材料の問題が取り上げられている。化粧品素材は、洗顔/洗髪などで環境への流出が避けられないため、SDGs の目標を満たす高分子素材への変換が重要である。アミノ酸ビニルモノマーライブラリーの拡張も進めており⁸⁾、構成アミノ酸の種類やその組み合わせによりゲル物性や刺激応答挙動を容易にチューニングできることも魅力である。良好な生体親和性や種々の物質の内包性がデザインできることも確認

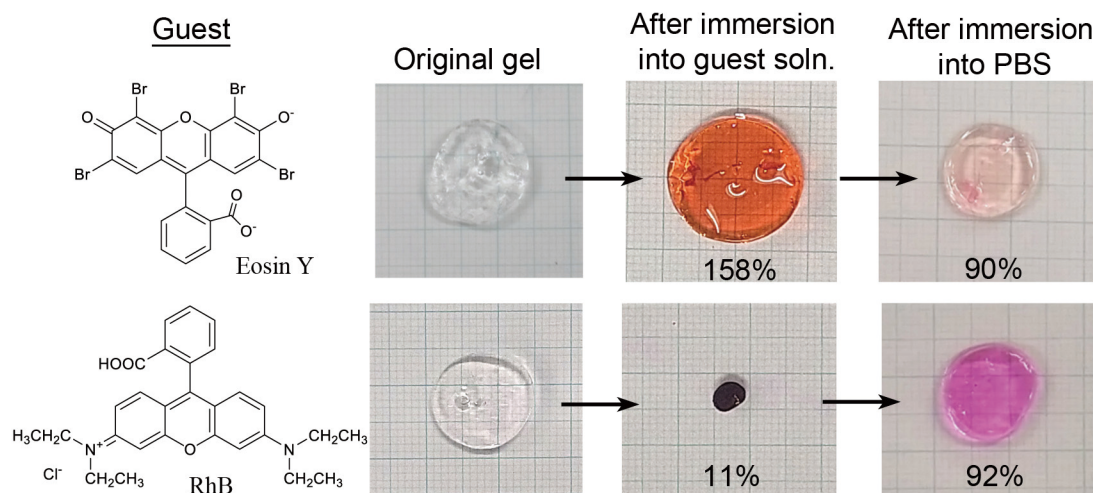


図5 P (NAGAm/NAD) ハイドロゲルのアニオン性Eosin Yおよびカチオン性RhBの取り込み/放出挙動.

された. 新しいスマートゲルとしてコスメティック分野での応用が期待される.

謝 辞

本研究の遂行にあたり, ご支援いただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます.

(引用文献)

- 1) S. Talebian, M. Mehrli, N. Taebnia, C. P. Pennisi, F. B. Kadumudi, J. Foroughi, M. Hasany, M. Nikkhah, M. Akbari, G. Orive, A. Dolatshahi-Pirouz, Self-Healing Hydrogels: The Next Paradigm Shift in Tissue Engineering?, *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1801664.
- 2) P. Bertsch, M. Diba, D. J. Mooney, S. C. G. Leeuwenburgh, Self-Healing Injectable Hydrogels for Tissue Regeneration, *Chem. Rev.* **2023**, *123*, 834.
- 3) M. A. Haque, T. Kurokawa, J. P. Gong, Super Tough Double Network Hydrogels and Their Application as Biomaterials, *Polymer*, **2012**, *53*, 1805.
- 4) Y. Osada, A. Matsuda, Shape Memory in Hydrogels, *Nature* **1995**, *376*, 219.
- 5) C. Löwenberg, M. Balk, C. Wischke, M. Behl, A. Lendlein, Shape-Memory Hydrogels: Evolution of Structural Principles To Enable Shape Switching of Hydrophilic Polymer Networks, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 723.
- 6) J. Shang, X. Le, J. Zhang, T. Chen, P. Theato, Trends in Polymeric Shape Memory Hydrogels and Hydrogel Actuators, *Polym. Chem.* **2019**, *10*, 1036.
- 7) N. Higashi, R. Sonoda, T. Koga, Thermo-responsive Amino Acid-based Vinyl Polymers Showing Widely Tunable LCST/UCST Behavior in Water, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 67652.
- 8) A. Sawamoto, S. Nishimura, N. Higashi, T. Koga, Synthesis of Amino Acid-derived Vinyl Polymers with Precisely Controlled Hydrophathy and Their Thermoresponsive Behavior in Water, *Polym. Chem.* **2023**, *14*, 2857.
- 9) Y. Yamaguchi, S. Nishimura, N. Higashi, T. Koga, Multistimuli Responsive Hydrogels with Shape Fix/Memory Capability Fabricated from Gold Nanorod-conjugated Amino Acid-based Vinyl Polymer Networks, *J. Polym. Sci.* **2024**, *62*, 3909.
- 10) T. Koga, K. Tomimori, N. Higashi, Transparent, High Strength, and Shape-memory Hydrogels from Thermo-responsive Amino Acid-derived Vinyl Polymer Networks, *Macromol. Rapid Commun.* **2020**, *41*, 1900650.
- 11) S. Nishimura, T. Yoshida, N. Higashi, T. Koga, Regulation of Cell Adhesion on Physically Crosslinked Hydrogels Composed of Amino Acid-based Polymers by Changing Elastic Modulus using Shape Fix/Memory Properties, *Adv. Mater. Technol.* **2024**, *9*, 2301598.