

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進 研究事業

腹膜播種巣を標的とする抗がん剤担持ヒアルロン酸ナノゲルと  
その徐放システムの開発に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 大知

平成23(2011)年 5月

## 研究報告書目次レイアウト

## 目 次

I. 総括研究報告		
(総括) 腹膜播種巣を標的とする抗がん剤担持ヒアルロン酸ナノゲルと その徐放システムの開発に関する研究		
(分担分) クリック反応in situ架橋ハイドロゲルの創製	-----	1
伊藤大知		
II. 分担研究報告		
1. ヒアルロン酸ナノゲル創製に関する研究	-----	27
鈴木幸光		
2. 腹膜播種モデルへのシスプラチン担持ヒアルロン酸ゲル投与に 関する研究	-----	37
北山丈二		
3. 腹膜播種モデルへのシスプラチン担持ヒアルロン酸ゲル投与に おける腹腔シスプラチン残留量の検討	-----	43
石神浩徳		
4. 腹膜播種モデルへのシスプラチン担持ヒアルロン酸ゲルのin vitro徐放 挙動に関する研究	-----	47
山口博紀		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	53
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	55
特願2011-122183		

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
（総括）研究報告書

腹膜播種巣を標的とする抗がん剤担持ヒアルロン酸ナノゲルと  
その徐放システムの開発

研究代表者 伊藤 大知 ・ 東京大学大学院医学系研究科 准教授

研究要旨

近年、胃がん腹膜播種に対し、タキソール腹腔投与の静脈投与に対する有効性が臨床試験で示された。しかしセカンドラインとして期待されるシスプラチン（CDDP）は、動物実験レベルでも腹腔からのクリアランスが速く、効果がない。さらに診断には非侵襲的な腹腔鏡の使用が標準となり、腹腔鏡と連動した投与方法が望まれる。このため効果的なCDDP腹腔投与方法を実現するために、新たな剤形の開発が必要である。

本研究では、新たに①CDDP担持ヒアルロン酸（HA）ナノゲルの作製を行う。加えてクリックケミストリーを架橋反応に利用した、②腹腔鏡で注入しながら、生体内で迅速架橋する新規in situ架橋ゲルを開発する。両者を融合し、HAナノゲルを含有したin situ架橋ゲル（ハイブリッドゲル、①+②）をマウス腹膜播種モデルに適用し、腹腔中で1週間に渡りCDDPを徐放し、3回投与で播種巣数を5%以下まで消失させ、臨床検討への基盤を作ることを目標としている。

3ヵ年計画初年度は、疾患生命工学センターグループ（代表者、分担者・鈴木）が、イミノ二酢酸を導入したヒアルロン酸の合成（HA-IDA）に成功し、さらにCDDP存在下で、直径が約100nmのヒアルロン酸ナノゲルを作製することに成功した。さらにこのHA-IDAナノゲルは、未修飾HAから作ったナノゲルと異なり、24時間経過後も、半分以上のCDDPを担持し続けた。さらに銅フリークリックケミストリーを架橋反応に利用した、新規in situ架橋ゲルの創製に成功した。

また腫瘍外科グループ（分担者・北山准教授・石神講師・山口助教）が、腹膜播種モデルに改善を加えて実験再現性を向上させるとともに、腹膜癒着防止用の既存のin situ架橋ハイドロゲルにCDDPを担持させて、播種増殖の抑制効果が増すことを示しつつある。

本研究、2年目は前年度の成果を踏まえ、腹膜播種マウスモデルにより、上記新材料のin vivoでの効果の検証を開始している。

以下、研究代表者の担当としたクリックハイドロゲルの創製についての詳細を述べる。

## A. 研究目的

近年報告された細胞毒性が低く・銅不要のクリック反応を架橋反応に用いた2液性in situ架橋ゲルを新たに開発する。骨格ポリマーには腹膜癒着防止材料として検討実績を有し、腹腔内分解性を有するヒアルロン酸 (HA) を用いた。アジド基修飾HA (A液) とアセチレン基修飾HA (B液) を新たに作製し、ダブルシリンジで混合時にクリック反応で架橋し、ゲル化が起こる。

## B. 研究方法

### 1.1. アジドの合成

まず、主鎖となる多糖のヒドロキシル基部分に修飾するアジドの合成を行った。側鎖からの分解を促すためには、エステル形成による修飾が望ましいため、市販の  $\gamma$ -アミノ酪酸から、カルボキシル基を持つアジドを合成した。

#### 1.1.1. イミダゾール-1-スルホニルアジドの合成

$\gamma$ -アミノ酪酸のアミノ基を、 $S_N2$  反応によってアジドに置換するための求核剤として、まずイミダゾール-1-スルホニルアジドの合成を行った。

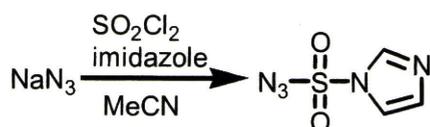


図1 イミダゾール-1-スルホニルアジドの合成

## <試薬>

アジ化ナトリウム (M=65.0)  
塩化スルフリル (M=134.965)  
アセトニトリル(脱水) (M=41.05)  
イミダゾール (M=68.08)  
炭酸水素ナトリウム (M=84.007)

## <手順>

- 1) 200 mL ナスフラスコにアジ化ナトリウム 3.20 g (50mmol) を加え、アセトニトリル(脱水) 50 mL を注いで攪拌、懸濁させた。
- 2) 氷浴に浸し、窒素雰囲気下にした。
- 3) ホールピペットを用いて塩化スルフリル 4 mL (50mmol, 1.0eq) を滴下。その後室温で一晩攪拌した。
- 4) 再びフラスコを氷浴に浸け、イミダゾール 6.80 g (0.1mol, 2.0eq) を加え、室温で攪拌。
- 5) 24 時間後攪拌を終了し、反応溶液を 500 mL 抽出漏斗に移した。
- 6) 酢酸エチル 50mL、純水 100 mL を加え抽出。有機相を漏斗に残し、再び純水 100 mL を加えて抽出。この操作を 3 回繰り返す。
- 7) 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を調製し、水相除
- 8) 有機相を 300 mL 三角フラスコに回収し、硫酸マグネシウムを加えて室温で一晩乾燥。
- 9) 濾過により硫酸マグネシウムを取り除いた後、溶液を 100 mL フラスコに移し、エバポレーターによって溶媒を留去。
- 10) 真空乾燥庫内にて数日真空乾燥させ、無色透明の目的生成物(液体)を得た。  
収量 5.14 g (29.7mmol) 収率 60.31%

### 1.1.2. $\gamma$ -アミノ酪酸のアジド化

1.1.1. で合成したイミダゾール-1-スルホニルアジドを求核剤として、アミノ酪酸にアジドを導入する。

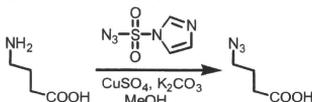


図2  $\gamma$ -アミノ酪酸のアジド化

#### <試薬>

イミダゾール-1-スルホニルアジド

(M=173.15)

$\gamma$ -アミノ酪酸(M=103.12)

硫酸銅(II) (M=159.6)

炭酸カリウム (M=138.21)

メタノール

濃塩酸

#### <手順>

1)300 mLナスフラスコに $\gamma$ -アミノ酪酸  
2.41 g(23.4mmol)、

硫酸銅 49.6  
mg(0.311mmol,1.3mol%)、炭酸カリウ  
ム 6.00 g(43.4mmol,1.9eq)を加えた。

2)メタノール 120 mLを加え、室温で攪  
拌

3)40 分後、イミダゾール-1-スルホニル  
アジド 4.88 g (28.2 mmol,1.2eq)を滴下  
し、室温で一晩攪拌

4)12MHClを数 mL滴下し、pH~11→3  
まで酸性化

5)反応溶液を 1L 分液漏斗に移し、純水  
250 mL、酢酸エチル 200 mLを加え、  
有機相を抽出。残した水相に再び酢酸  
エチル 100 mLを加え、洗浄(×3回)

6)有機相を回収し、硫酸マグネシウム  
を加えて室温で一晩乾燥

7)硫酸マグネシウムを濾過後、エバポ  
レートにより溶媒を留去。

8)真空乾燥により、薄黄色の目的生成  
物(液体)を得た。

収量 3.677g (28.48mmol) 収率  
122%

1.2. シクロオクチンの合成  
 アジドと同様、多糖のヒドロキシル基とのエステル形成により修飾を行うため、末端にカルボニル基を持つシクロオクチンを合成した。  
 市販のシクロヘプテンを原料とし、3stepの合成で目的生成物を得た。

1.2.1. シクロヘプテンへのプロモホルム付加

<試薬>

- cis-シクロヘプテン (M=96.17)
- カリウム tert-ブトキシド (KOtBu) (M=112.21)
- プロモホルム(CHBr<sub>3</sub>) (M=252.7)
- 濃塩酸(12mol/dm<sup>3</sup>) (M=36.46)
- 脱水ペンタン (M=72.15)
- ペンタン (M=72.15)

<手順>

- 1)500mL 三口フラスコに脱水ペンタン 100 mL を注ぎ、シクロヘプテン 7.62 g(79.27mmol)、カリウム tert-ブトキシド 17.77 g(0.16mol,2.0eq)を加えて攪拌
- 2)フラスコを氷浴に浸し、窒素雰囲気下に

また、低温循環水槽に接続したチューブを氷浴内に巻き付け、-10°Cで不凍液を循環

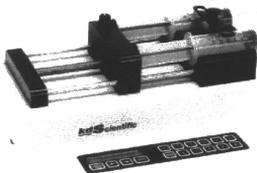


図4 Two-syringe Infusion Pump KDS 200

- 3)40 分後、マイクロシリンジによってプロモホルム 30.02 g(0.12mol,1.5eq)→10.35 mL

を滴下。滴下時間はシリンジポンプにより厳密に制御(30時間 5.75μl/min)  
 4)滴下終了後、更に室温で一晩攪拌  
 5)滴下終了から 20 時間後、純水 200 mL、12MHCl を 2 mL 程度加え、溶液を中和

- (pH10.8→~6)  
 6)2L 抽出漏斗に溶液を注ぎ、有機相を回収。残った水相にペンタン 100 mL を加え、抽出 (×3 回)  
 7)回収した有機相を再び抽出漏斗に注ぎ、純水 200 mL を加えて洗浄(×3)  
 8)取り出した有機相約 500 mL に硫酸マグネシウムを加え、一晚乾燥  
 9)硫酸マグネシウム濾過後、エバポレーターにより溶媒を留去  
 10)真空乾燥により、黒茶色の目的生成物を得た。目的生成物は分子内対称軸を持ち結晶性であるため、精製の純度を上げることで一部固体化した。  
 収量 8.8147 g (32.89mmol)  
 収率 44.5%

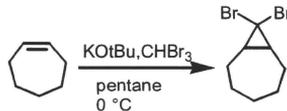


図3 シクロヘプテンのプロモホルム付加

### 1.2.2. グリコール酸メチル付加

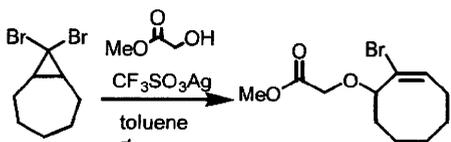


図5 グリコール酸メチル付加

#### <試薬>

ブromoホルム付加体(M=267.99)  
グリコール酸メチル(M=90.08)  
トリフルオロメタンスルホン酸銀  
(Tfo-Ag) (M=256.94)  
トルエン (M=92.14)

#### <手順>

- 1)100mL ナスフラスコにジプロミド 4.01 g(14.96mmol)、グリコール酸メチル 13.37 g(0.15mol,9.9eq)を加えた後、トルエン 20mL を注ぎ溶解
- 2)フラスコをアルミホイルで遮光した後、Tfo-Ag11.43 g(44.49mmol,3.0eq)を加え、そのまま室温で攪拌
- 3)27 時間後、TLC により生成物を確認

4)28 時間後、攪拌を止め、エバポレーターによりトルエンを留去

5)ヘキサン:酢酸エチル=5:1 の溶出液を調製し、フラッシュカラムクロマトグラフィーを行った。Rf=3.5~4

カラム体積の 2.5 倍程度溶出液を流したところで trans 体の溶出を確認。以後の溶液を回収し、カラム体積の 10 倍程度まで溶出を続けた。

6)溶出液を 500 mL ナスフラスコに回収し、順次エバポレーターによって溶媒を留去

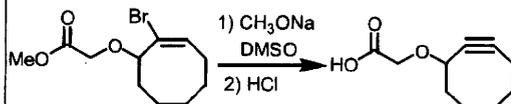
7)真空乾燥により濃黄色の目的生成物(液体)を得た。

収量 2.84 g (10.23mmol)

収率 68.4%

### 1.2.3. 脱臭素アルキン化と末端メチルエステルの加水分解

E2 脱離により、HBr が引き抜かれてアルキンとなる



〈図6 脱臭素アルキン化と末端メチルエステルの加水分解

葉

〈試薬〉

グリコール酸メチル付加体 (M=277.15)

DMSO(脱水) (M=78.13)

ナトリウムメトキシド (CH<sub>3</sub>ONa) (M=54.02)

1MHCl (M=36.46)

塩化メチレン (M=84.93)

d=1.3266g/cm<sup>2</sup>

〈手順〉

・シクロオクチン誘導体 2.84 g (10.23 mmol)

・ナトリウムメトキシド 3.76g (69.56 mmol, 6.8eq)

1)200mL ナスフラスコにナトリウムメトキシド 3.76 g(69.56mmol, 6.8eq)を加え、

脱水メタノール 110mL に溶解

30°C程度の溶解熱が発生

2)同フラスコに脱水DMSO6.5mLを滴下、攪拌

3)10分後、シクロオクチン誘導体 2.84 g(10.23mmol)を滴下。

窒素雰囲気下にして、室温で一晩攪拌

4)エバポレートにより、メタノールを留去

5)溶液を 500 mL 抽出漏斗に加えた後、1.2MHCl 200 mL、塩化メチレン 100 mLを加え、抽出

6)残った水相に再び塩化メチレンを 100mL 加え、抽出(×3回)

7)有機相を回収し、硫酸マグネシウムを加えて一晩乾燥

8)硫酸マグネシウムを濾過後、エバポレートにより溶媒を留去

9)真空乾燥により、濃黄色の目的生成物(液体)を得る。

収量 2.2485 g (12.34mmol) 収率 121%

### 1.3. FT-IR による click 反応の検証

実際に合成したアジドとシクロオクチンがトリアゾール環を形成するのか、アジド基のピークの経時変化を FT-IR で追跡することで検証した。アジド基のピークは  $2100\text{ cm}^{-1}$  付近に現れるため、 $1500\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$  に吸収帯を持たないクロロホルムを溶媒として用いた。

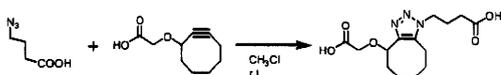


図 7 アジドとシクロオクチンの [3+2]付加環化によるトリアゾール環形成

実験

<試薬>

$\gamma$ -アジド酪酸

シクロオクチン

クロロホルム

<手順>

- 1) 合成した  $\gamma$ -アジド酪酸、シクロオクチンをそれぞれクロロホルムに溶解し、それぞれ  $10\text{ mol/L}$  に調製する
- 2) FT-IR 測定用の岩塩板に両溶液を  $100\text{ }\mu\text{L}$  ずつ滴下し、30 秒後に混合溶液の吸光度を測定
- 3) その後、1 分おきに吸光度を測定。20 分 30 秒後まで測定を続けた。
- 4)  $5\text{ mol/L}$  に調製したアジドの吸光度を測定し、反応開始前の初期吸光度を補正した。

### 1.3.1. 転化率の導出

各時間におけるアジドのピーク面積の比より、アジドからトリアゾール環への転化率を算出した。結果を以下に示す。

### 1.3.2. 反応速度定数の導出

$$[\text{azide}]_0 = [\text{yne}]_0 = 5\text{M}$$

$$[\text{azide}] = [\text{yne}]$$

$$\frac{d[\text{azide}]}{dt} = -k[\text{azide}][\text{yne}] = -k[\text{azide}]^2$$
$$\frac{1}{[\text{azide}]} - \frac{1}{[\text{azide}]_0} = kt$$

転化率を  $X$  とすると

$[\text{azide}] = [\text{azide}]_0(1-X)$  より、代入して

$$\frac{1}{[\text{azide}]_0(1-X)} - \frac{1}{[\text{azide}]_0} = kt$$

上式は反応時間と転化率のみの関数となり、傾きが反応速度定数を示す。

## 2. プレカーサーポリマーの合成

合成したアジド、シクロオクチンのカルボン酸部分と、ヒアルロン酸をエステル結合させることで、アジド化、シクロオクチン化ポリマーを合成した。エステル合成は水中では進行しないため、非プロトン性極性溶媒であるジメチルスルホキシド(DMSO)中で行った。しかし、親水性の強いヒアルロン酸(HA)はDMSOに不溶であるため、相間移動触媒であるテトラブチルアンモニウムヒドロキシド(TBA+OH<sup>-</sup>:以降TBAと表記する)と反応させ、DMSOに可溶化するという前処理を行ってからエステル化した。

<テトラブチルアンモニウムヒドロキシド>

水にも有機溶媒にも可溶な長鎖アルキルアンモニウムカチオンを持ち、水相中のアニオン性求核試薬の対カチオンと交換することで、求核剤を有機相に運ぶ。

アルキル鎖の立体障害により、アンモニウムカチオンと対アニオンとのイオン間相互作用はそれほど大きくない。

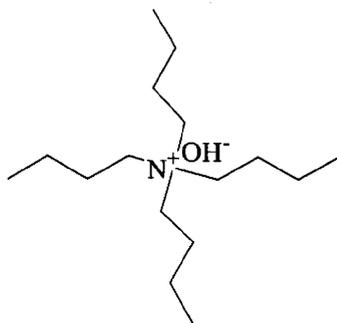


図8 テトラブチルアンモニウムヒドロキシド

### 2.1.1. TBA置換によるDMSOへの可溶化

原料となるHAは、側鎖のカルボキシル基のプロトンの大部分がNa<sup>+</sup>と置換した形で存在している。エステル化によりアジドorシクロオクチンをHAに導入する場合、水系では反応が進行しないため、DMSOを溶媒として行うことにした。

しかし、カルボキシル基がプロトンorNa置換型の場合、非常に強いイオン間相互作用により、DMSO中で溶媒和が生じない。そこで、相間移動触媒であるTBA+OH<sup>-</sup>を添加し、カルボキシル基をイオン相互作用の弱いTBA置換型へと変換した上でエステル化を行った。

<試薬>

使用した各サンプルの分子量

- ・FCH-SU (Mw = 80,000 Da)
- ・FCH-80 (Mw = 800,000 Da)

陽イオン交換樹脂

テトラブチルアンモニウムヒドロキシド(TBA+OH<sup>-</sup>)

## 2.1.2. ヒアルロン酸のエステル化

<試薬>

ヒアルロン酸

$\gamma$ -アジド酪酸 (M=129.12)

or

シクロオクチン (M=182.22)

カルボニルジイミダゾール (CDI)  
(M=162.15)

ジメチルスルホキシド (DMSO)  
(M=78.13)

1) AGU, CDI, アジド or シクロオクチンの量論比が 1:3:3 となるように試薬を計量

2) 20mL ナスフラスコにアジド or シクロオクチン, CDI を加え, DMSO に溶解してカルボキシル基を活性化

3) 200mL ナスフラスコに DEX を加え, DMSO に溶解. 5 分程で完全に溶解した。

4) 1 時間反応させた 2) を 3) に滴下。

3) は滴下する 10 分前から 60℃ に加熱

5) そのまま 60℃ に加熱したまま攪拌を続ける。

6) 16~20 時間後, 加熱, 攪拌を終了し, 室温で静置。

7) 一時間後, 純水 3L 中で透析開始. 一時間ごとに水を取り換える。

8) 3日ほど透析を続けた後, ファルコンチューブに回収し, 凍結乾燥

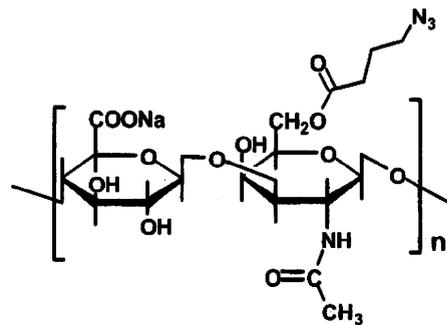


図9 アジド化 HA

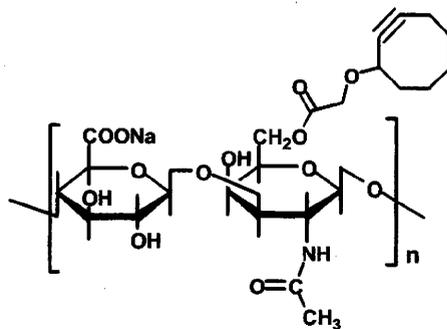


図10 シクロオクチン化 HA

(倫理面への配慮)  
材料合成のために、特段の配慮は必要  
ない

### 3.ゲル化速度の測定

ポリマーの分子量と濃度がゲル化時間にどのように依存しているのか、定量的に検証を行った。

用いたポリマー

- ・FCH-SU-アジド (Mw = 80,000 Da エステル化率10.8%)
- ・FCH-SU-シクロオクチン(Mw = 80,000 Da エステル化率12.6%)
- ・FCH-80-アジド(Mw = 800,000 Da エステル化率25.3%)
- ・FCH-80-シクロオクチン(Mw = 800,000 Da エステル化率14.6%)

<手順>

(n=4で実験を行った)

- 1)各ポリマーをPBSに溶解し、濃度が5.0、3.0、2.0、1.5、1.0 wt%となるように調製
- 2)35mmディッシュ(IWAKI製)に5mmのテフロン攪拌子(93-5653)を乗せ、300rpmで回転させた
- 3)マイクロピペットを用いて、FCH-オクチン溶液を100 $\mu$ L滴下
- 4)続いてFCH-アジド溶液100 $\mu$ Lを滴下し、滴下後からゲル化までの時間を測定した。

厳密なゲル化時間は粘弾性測定により定義される(詳細は後述)が、本実験では攪拌子の回転挙動の変化・溶液の形状変化などを目視により確認し、ゲル化したものと判断した。

また、生体内にポリマー溶液をインジェクションした際の混合挙動に関しては様々に議論の余地があるが、*in vitro*でそれらをモデル化することは困難であり、本研究の及ぶところではない。そのため本実験では「ポリマーの分子量」と「濃度」の2点がゲル化に及ぼす影響を相対的に比較することを目的とし、攪拌速度は全て300rpmに固定した。

#### 4. ゲル膨潤度・分解挙動評価

水中でのゲルの膨潤挙動は、材料としての特性を評価する上で重要な指標となる。例えば膨潤し易いゲルほど架橋密度が小さく、力学的強度は弱い。また、溶液との親和性が高く、内部拡散における自由度が高い。このような性質の大小は材料設計をする上で非常に重要な指標であり、膨潤挙動を観察することでそれらを評価することができる。また、本研究で作製したゲルは、側鎖にエステル結合を用いているため、水中での穏やかな分解が期待される。

膨潤度は以下の式で定義される

膨潤度 =  $\frac{W_t}{W_{t_0}} \times 100$  (%)     $W_{t_0}$ …ゲルの初期重量     $W_t$ …t 時間後におけるゲルの重量

##### <試薬>

用いたゲル

- ・FCH-SU    3.0wt%混合、2.0wt%混合、1.5wt%混合
  - ・FCH-80    3.0wt%混合、2.0wt%混合、1.0wt%混合
- PBS

##### <手順>

(n=4 で実験を行った)

- 1)FCH-アジド、FCH-シクロオクテンをそれぞれPBSに溶解し、濃度が3.0、2.0、1.5、1.0 wt%となるように調製
- 2)シリコンラバーをくり抜き、半径6.5mm、高さ3mmのモールドを作製(内容積約400 $\mu$ L)
- 3)ダブルシリンジに濃度の等しい両ポリマーを入れ、モールドに注入
- 4)室温でゲルになるまで固定(固定時間はポリマー濃度により異なる)
- 5)作製したゲルをモールドから取り出し、35mm ディッシュに乗せ、ゲルの重量 $W_{t_0}$ を測定
- 6)各ディッシュに4mL ずつPBS(メディア)を加える
- 7)37°C恒温槽にてインキュベート
- 8)各サンプリング時間 t においてディッシュを取り出し、メディアを回収し、ゲルの重量 $W_t$ を測定→膨潤度を算出
- 9)新しいメディアを4mL 加え、再び恒温槽でインキュベート

ゲルがメディア中で完全に分解されるまで、上記の操作 8)、9)を繰り返した。

## 5. ゲルの生体適合性評価 (Live/Dead Assay)

<細胞>

NIH 3T3 NIH Swiss マウス胎仔由来の線維芽細胞

<培地>

D-MEM(調整済み)

<試薬>

PBS 溶液

Calcein AM

Ethidium homodimer-1

<サンプル>

FCH-SU-アジド(Mw = 80,000 Da  
エステル化率 10.8%)

FCH-SU-シクロオクテン(Mw = 80,000 Da  
エステル化率 12.6%)

<手順>

- 1)UV 滅菌後の FCH-SU-アジド、シクロオクテンを PBS に溶解する。
- 2)培地をパスツールピペットで吸引する。
- 3)PBS 10 mL を加え、洗浄・吸引。浮遊細胞や死細胞を除去する
- 4)トリプシン 5 mL を加え、5 分間 37°C 恒温槽でインキュベート。細胞を剥離させた。

5)培地を加え、剥離した細胞をトリプシンごと 50mL ファルコンチューブに回収する

一部を取り分け、トリパンブルーで染色して細胞数をカウントする。

6)(1000rpm, 3min)で遠心分離を行い、細胞をチューブ底に集める

7)上澄み液をアスピレーターで除去し、PBS を加え、細胞濃度を  $5 \times 10^6$  個/mL とする。よくサスペンドして細胞分布を均一に

8)1)で調製したポリマー溶液に、細胞懸濁液を加え、ポリマー濃度 3.0wt%、細胞濃度  $2 \times$

$10^6$  cells/mL の PBS 溶液を調製する。

9)ダブルシンジで 8)に溶液を移し、35mm ガラスボトムディッシュ(マツナミ)上に注入

10)2 時間程室温で静置し、ゲル化を確認

11)ディッシュに新しい培地 4mL を加え、37°C 恒温槽でインキュベート

12)1 日後、アスピレーターで培地を吸引し、PBS に浸してゲル中に浸透した培地を除去

13)ゲルから培地が完全に除去されたのを確認し、CalceinAM、EthD-1 を 100 $\mu$ L ずつ添加

14)30 分程静置し、共焦点顕微鏡を用いてゲル内部の蛍光画像を取得する。

15)それぞれの色素で染色された細胞数の比から、ゲルに封入された細胞の生存率を算出

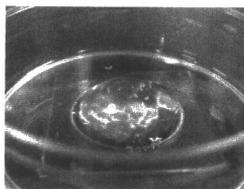
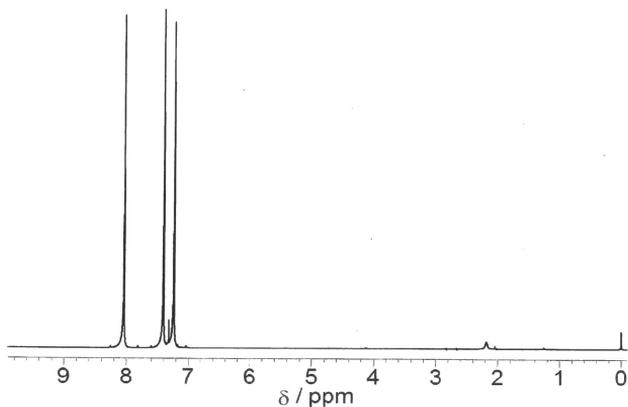


図 12 3T3 細胞を封入したゲル

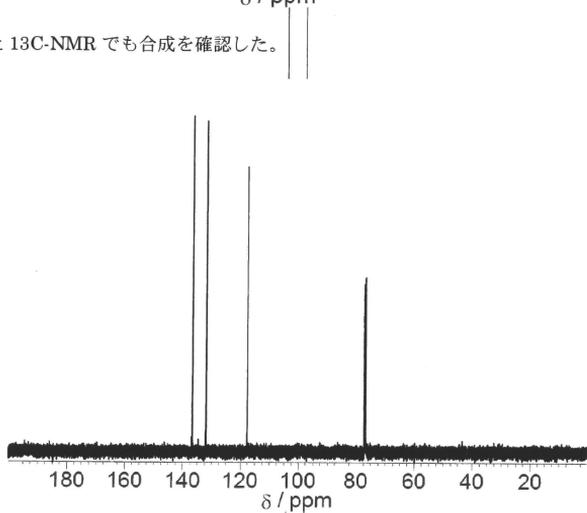
C. 研究結果

1.1.1. イミダゾール-1-スルホニル  
アジドの合成

下記のように  $^1\text{H-NMR}$  によって  
合成を確認した。

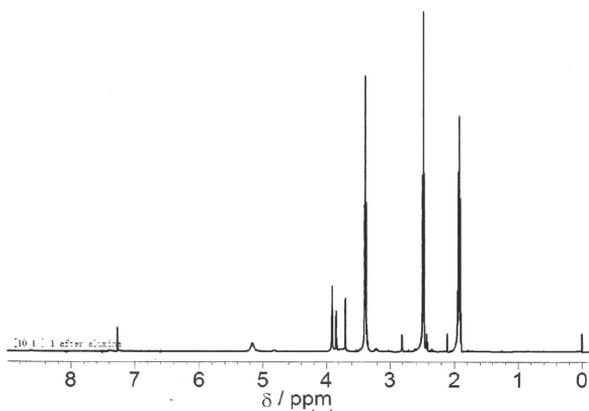


また  $^{13}\text{C-NMR}$  でも合成を確認した。

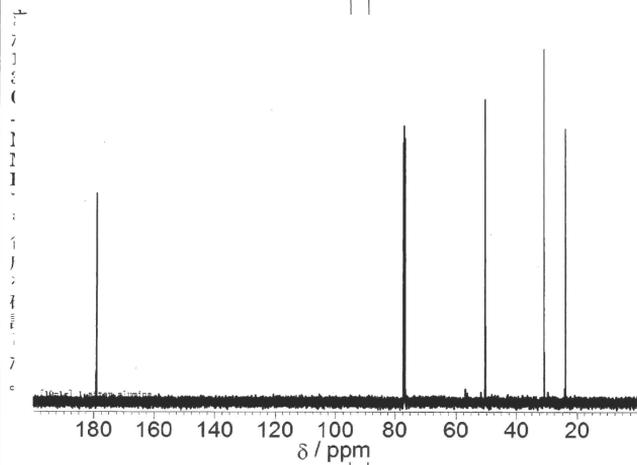


### 1.1.2. $\gamma$ -アミノ酪酸のアジド化

下記のように  $^1\text{H-NMR}$  によって合成を確認した。



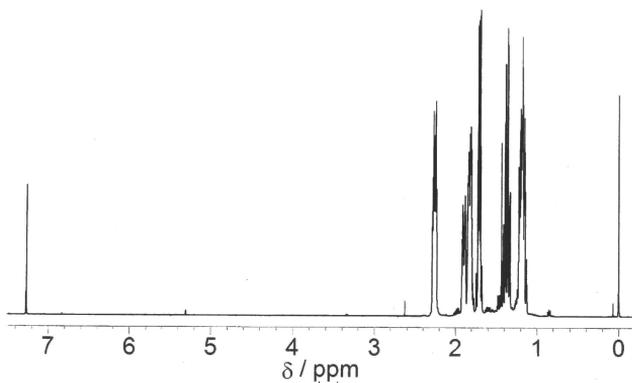
また  $^{13}\text{C-NMR}$  でも合成を確認した。



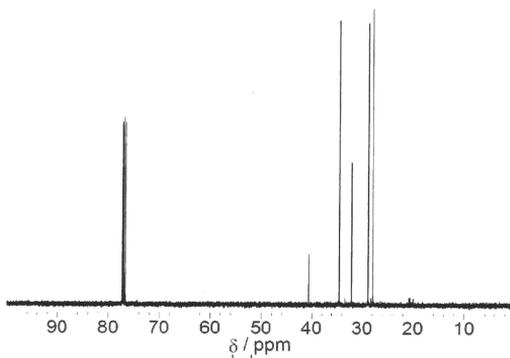
## 1.2. シクロオクチンの合成

### 1.2.1. シクロヘプテンへのプロモホルム付加

下記のように  $^1\text{H-NMR}$  によって合成を確認した。

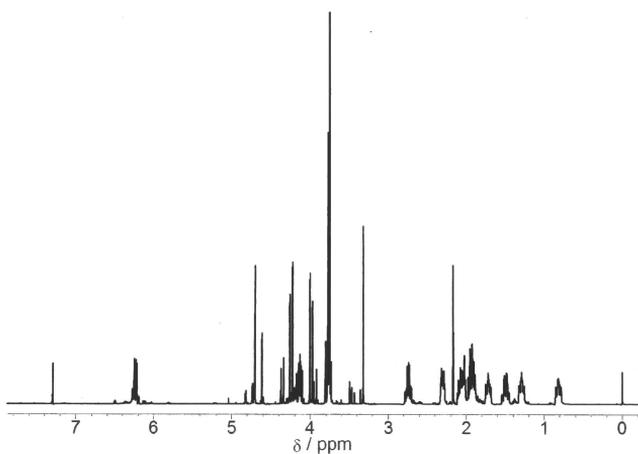


また  $^{13}\text{C-NMR}$  でも合成を確認した。

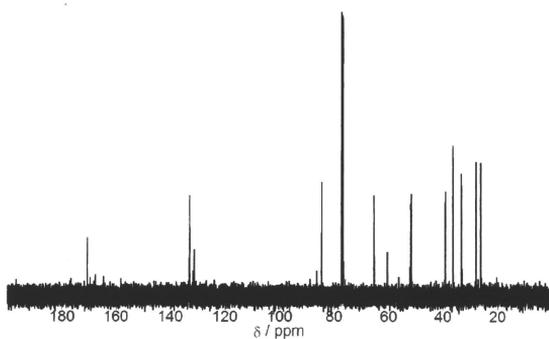


### 1.2.2. クリコール酸メチル付加

下記のように  $^1\text{H-NMR}$  によって  
合成を確認した。

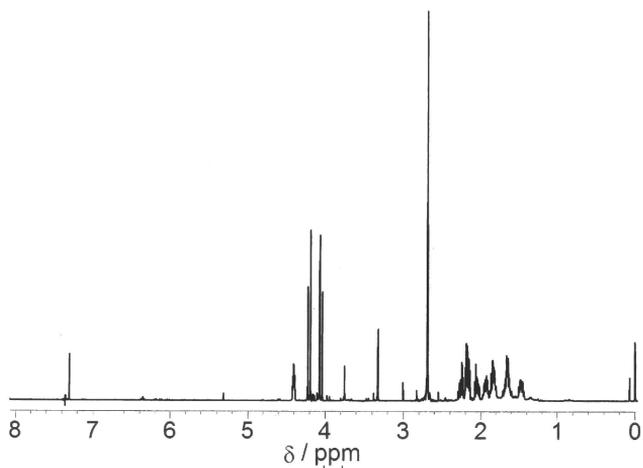


また  $^{13}\text{C-NMR}$  でも合成を確認した。

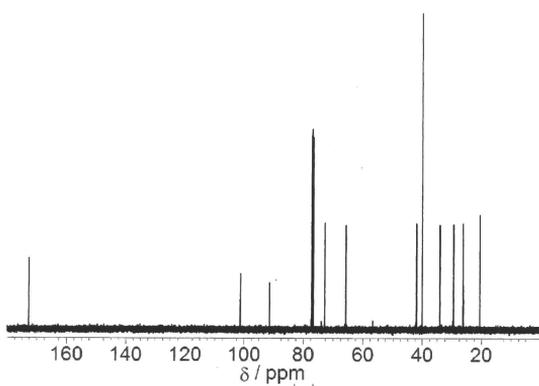


### 1.2.3. 脱臭素アルキン化と末端メチル エステルの加水分解

下記のように $^1\text{H-NMR}$ によって  
合成を確認した。



また $^{13}\text{C-NMR}$ でも合成を確認した。



### 1.3. FT-IRによるclick反応の検証

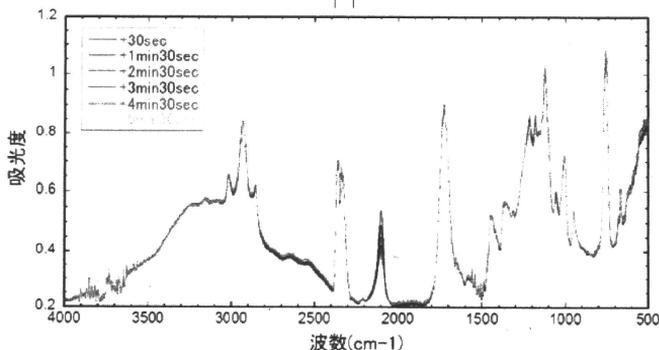


図 11 アジド+クリック反応溶液の吸光度変化

2100  $\text{cm}^{-1}$  付近のアジド基の吸収ピークにのみ注目すると、滴下直後から急激に減少していることが分かる。これより、click 反応によってアジドが消費され、トリアゾール環が形成されていることが確認された。

各時間におけるアジドのピーク面積の比より、アジドからトリアゾール環への転化率を算出した。図より反応開始からおよそ 300 秒で 50%、600 秒で 60% のアジドが消費されたことが分かる。反応はアジドとシクロオクテンの濃度に比例する二次反応であり、非常に速く進行する。これは *in situ* 架橋反応としては理想的な反応であることがわかる。

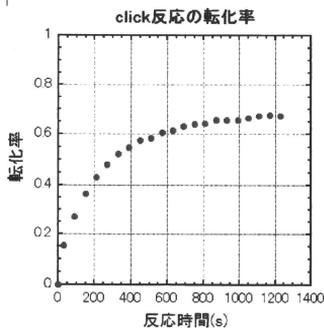


図 12 click 反応の転化率