β -シクロデキストリン修飾デンドリマーの合成と 蛍光および吸収スペクトルによる包接能の研究

峯岸 麻衣子*・石井 浩**・中田 宗隆*

*東京農工大学大学院生物システム応用科学研究科 小金井市中町 (〒184-8588)

**東京工業高等専門学校 八王子市梶田町 (〒193-0997)

(2002年11月8日 受理)

Synthesis of β -Cyclodextrin Modified Dendrimer and Study of Its Ability in
Inclusion-Complex Formation by Fluorescence and Absorption Spectroscopies

Maiko MINEGISHI*, Hiroshi ISHII**, and Munetaka NAKATA*

*Graduate School of BASE (Bio-Applications and Systems Engineering),
Tokyo University of Agriculture and Technology, Naka-cho, Koganei 184-8588

**Department of Chemical Science and Engineering, Tokyo National College of Technology,
Kunugida-machi, Hachioji 193-0997

(Received November 8, 2002)

The second generation poly(amidoamine) dendrimer (PAMAM dendrimer) was prepared from ethylenediamine and methyl acrylate by a divergent method. The terminal amine groups of PAMAM dendrimers were modified with carboxymethyl β -cyclodextrin by dehydration condensation using 1-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline. The ability in inclusion-complex formation of β -cyclodextrin, PAMAM dendrimer, and β -cyclodextrin modified dendrimer was investigated by fluorescence and ultraviolet-visible absorption spectroscopies, where 8-anilino-1-naphthalene sulfonate and acid orange 7 were chosen as guest molecules. The observed spectral changes showed that the ability in inclusion-complex formation of β -cyclodextrin modified dendrimer was greater than that of β -cyclodextrin or PAMAM dendrimer.

Keywords: Dendrimer/ β -Cyclodextrin/Inclusion Complex/Fluorescence and Absorption Spectra

1. はじめに

近年、超分子機能材料の設計において、デンドリマーの利用が注目を集めている。デンドリマーは中心から外側に向かって規則正しく樹木のように枝分かれした三次元の多分岐高分子であり、従来の高分子とは異なり、分子量、サイズ、形状などの制御や、その中心核、分岐鎖、表面末端などへのさまざまな官能基の導入が可能である。たとえば、1985年に Tomalia らによって最初に合成されたポリ(アミドアミン)デンドリマー(以下、PAMAM デンドリマーとする)は表面末端に活性なアミノ基を持ち、生体適合性を有し、DNA との相互作用を利用した遺伝子ベクター、環境変化を利用したドラッグデリバリーシステムなどに応用されている¹⁻³⁾。しかし、PAMAM デンドリマーのみでは、その機能は十分であるとはいえない。すなわ

ち、遺伝子ベクターとして利用するためには、低世代の包接能が弱すぎることで、高世代になると細胞毒性が強すぎるなど懸念されている。また、これまでのドラッグデリバリーシステムでは、水中でゲスト分子を放出してしまうことなどの問題点がある。このような問題点を解決するために、活性な末端アミノ基を糖や直鎖型のポリマーなどの官能基で修飾した PAMAM デンドリマーの合成が報告され、その機能性についての研究が行われている^{4,5)}。

本研究では、分子内の疎水的空孔を利用したホスト-ゲスト化合物を形成する β -シクロデキストリン(以下、 β -CD とする)を PAMAM デンドリマーの表面末端に配位した CD-デンドリマーを新規に合成し、そのホスト-ゲスト化合物の包接能を検討することを目的とする。 β -CD を修飾することによって、PAMAM デンドリマーの溶解度の向上、環の歪みや官能基の付加によるゲスト分子包接の

8-Anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS)

Acid Orange 7 (AO-7)

Fig. 1 Guest molecules.

選択性の変化などが期待できる。包接錯体形成の確認のためには、水溶液中で疎水域に取り込まれると強く蛍光を発する8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸（以下、ANSとする）と、 β -CDに包接されると可視光領域の吸収スペクトルが変化するアシッド・オレンジ7（以下、AO-7とする）をゲスト分子として用いて、検討を行う（Fig. 1）。

2. 合成およびキャラクタリゼーション

2.1 試薬と分析機器

エチレンジアミン、アクリル酸メチル、メタノール、ジエチルエーテル、 β -CD、水酸化ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム十二水和物、リン酸二水素ナトリウム一水和物は和光純薬㈱より購入した。 β -CDは蒸留水から再結晶して用いた。モノクロロ酢酸はナカライテスク㈱より購入した。水素化ホウ素ナトリウム、ジメチルスルホキシドは純正化学㈱より購入した。ジメチルスルホキシドはモレキュラーシーブを用いて脱水した。2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロキノリンは国産化学㈱より購入した。ANSは東京化成㈱より購入した。AO-7は合成したものを再結晶させてから用いた。合成したデンドリマーおよびCD-デンドリマーはSPECTRUM社製の透析膜 Float-A-Lyzer Biotech CE（分画分子量=2000）を用いて精製した。溶媒には東京理化学器械㈱製のSA-2100Eによって精製した蒸留水を用いた。

核磁気共鳴スペクトル、赤外吸収スペクトル、紫外可視スペクトル、および蛍光スペクトルの測定には、それぞれ、

Scheme 1

Varian ㈱製の核磁気共鳴装置 GEMINI 300（共鳴周波数：300 MHz）、日本分光㈱製のフーリエ変換赤外分光光度計 FTIR-8000、日本分光㈱製の紫外可視分光光度計 U-best 50、島津製作所㈱製の分光蛍光光度計 RF-5300PC を用いた。

2.2 合成

PAMAM デンドリマーは文献¹⁻³⁾に従って、中心核にエチレンジアミンを用いたダイバージェント法によって合成した。末端が4本であるブランチ・オリゴマー、末端が8本である第1世代 PAMAM デンドリマー、末端が16本である第2世代 PAMAM デンドリマーの合成の確認は NMR スペクトルの測定によって行った。

β -CD は PAMAM デンドリマーのアミノ末端基と反応させるために、次のような操作によって、一つの水酸基の水素をカルボキシメチル基で置換した（Scheme 1）。まず、 β -CD、水酸化ナトリウム、水素化ホウ素ナトリウムを蒸留水に溶解して、80℃で加熱した。さらに、モノクロロ酢酸水溶液をゆっくりと滴下して、45分間攪拌した。放冷後、メタノールを加えて得られた白色沈殿を乾燥させ、カルボキシメチルシクロデキストリン（以下、CMCD とする）を合成した。

CMCD の PAMAM デンドリマーへの導入には、脱水縮合反応を用いた（Scheme 2）。すなわち、縮合剤である2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロキノリンを加えたジメチルスルホキシドに PAMAM を溶かし、PAMAM デンドリマーのアミノ末端基に対して過剰の CMCD を加え、室温で4日間攪拌した。メタノールを加えて得られた白色沈殿を乾燥させ、再び蒸留水に溶かした後にメタノールで沈殿させた。以上の操作によって、CD-ブランチ・オリゴマー、第1世代、第2世代の CD-デンドリマーを新規に合成し、透析膜によって精製した。同定した IR および NMR データは以下の通りである。

CD-ブランチ・オリゴマー：IR (KBr Disk) 3370 ($\nu_{\text{O-H}}$ & $\nu_{\text{N-H}}$), 2930 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1645 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1597 ($\nu_{\text{N-H}}$) cm^{-1} , $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O) δ 5.25 and 5.05 (H1, CD), 4.28–3.66 (H3, H5, H6, CD), 3.67–3.50 (H2, H4, CD), 3.50–3.42 ($-\text{CH}_2-$), 3.10–3.03 ($-\text{CH}_2-$), 2.87–2.75 ($-\text{CH}_2-$), 2.62 ($-\text{CH}_2-$), 2.48–2.42 ($-\text{CH}_2-$).

第1世代 CD-デンドリマー：IR (KBr Disk) 3370 ($\nu_{\text{O-H}}$ & $\nu_{\text{N-H}}$), 2930 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1645 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1556 ($\nu_{\text{N-H}}$) cm^{-1} , $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O) δ 5.25 and 5.05 (H1, CD),

Scheme 2

4.27–3.80 (H3, H5, H6, CD), 3.65–3.50 (H2, H4, CD), 3.53–3.47 (–CH₂–), 3.33–3.26 (–CH₂–), 3.01–2.97 (–CH₂–), 2.87–2.77 (–CH₂–), 2.64–2.58 (–CH₂–), 2.48–2.38 (–CH₂–).

第2世代CD-デンドリマー：IR (KBr Disk) 3370 ($\nu_{\text{O-H}}$ & $\nu_{\text{N-H}}$), 2930 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1645 ($\nu_{\text{C=O}}$) cm^{-1} , $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D₂O) δ 5.25 and 5.05 (H1, CD), 4.22–3.80 (H3, H5, H6, CD), 3.67–3.50 (H2, H4, CD), 3.48–3.37 (–CH₂–), 3.33–3.25 (–CH₂–), 3.07–2.95 (–CH₂–), 2.88–2.74 (–CH₂–), 2.66–2.57 (–CH₂–), 2.48–2.37 (–CH₂–).

2.3 包接能の確認

包接実験には水溶液を用いた。ANSは濃度を変化させるとスペクトルも変化するので、濃度は常に $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ で一定とした。β-CD および CD-デンドリマーの量は CD 部位の濃度が一定になるように調整した。また、第2世代 PAMAM デンドリマーは第2世代 CD-デンドリマーと濃度が同じになるよう調整した。それぞれの水溶液の蛍光スペクトルの測定には光路長 1 cm の五面透明石英セルを用い、室温で行った。

AO-7 の濃度は $5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ で一定とし、ANS のときと同様に、β-CD および CD-デンドリマーの量は CD 部位の濃度が一定になるように調整した。また、第2世代 PAMAM デンドリマーは第2世代 CD デンドリマーと濃度が同じになるように調整した。

3. 結果と考察

3.1 ANS の蛍光スペクトル

各世代の CD-デンドリマーに導入された β-CD の数は $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの水素のピーク強度比から算出した。その結果、CD-ブランチ・オリゴマーでは平均3個、第1世代 CD-デンドリマーでは平均5個、第2世代 CD-デンドリマーでは平均10個の CD ユニットを含むことを確認できた。すなわち、すべての世代で、約60%のアミノ末端基が β-CD で置換されたことがわかった。CMCD が PAMAM デンドリマーの表面末端のすべてに導入できなかった理由としては、先に結合した β-CD の未反応アミ

ノ末端基に対する立体障害が考えられる。

ANS は、水溶液中では極めて弱い蛍光しか観測されないにもかかわらず、有機溶媒中や水溶液中で血清アルブミンなどの疎水部に吸着されると、強い蛍光を示すことが知られている⁶⁾。また、疎水性の強さに応じて、蛍光波長は短波長側へシフトする。Fig. 2A に β-CD および各世代の CD-デンドリマーをホスト分子として用いたときの ANS の蛍光スペクトルを示す。図から明らかなように、β-CD よりも CD-デンドリマーの方が蛍光強度の向上と短波長側へのシフトが見られた。また、CD-デンドリマーの世代が増すにつれて、蛍光強度が増大することもわかった。

Fig. 2B に第2世代 PAMAM デンドリマー、第2世代 CD-デンドリマー、または β-CD と PAMAM デンドリマーの混合物をホスト分子としたときの ANS の蛍光スペクトルを示す。第2世代 PAMAM デンドリマーでも、蛍光強度の増大が確認された。しかし、第2世代 CD-デンドリマーをホスト分子としたときの方が、蛍光強度はより増大した。また、β-CD と PAMAM デンドリマーの混合溶液では、第2世代の PAMAM デンドリマーとほとんど変わらない蛍光強度を示した。以上のことから、CD-デンドリマーが PAMAM デンドリマーあるいは β-CD よりも ANS を効率よく包接し、その効率は CD-デンドリマーの世代が増すにつれて向上することがわかった。

ポリマーに結合した CD は、多環芳香族に対して、有効な協同的包接能を示すことが報告されている^{7,8)}。また、二つの CD を分子の鎖でつないだ CD ダイマー類が合成され、その包接能の研究が行われている^{9,10)}。その結果、二つの CD が適当な距離で存在するときに、包接能の増大が示唆されている。今回の結果は第2世代のデンドリマーに結合した β-CD が ANS を包接するための適した距離を保つことができたと考えられる。

CD-デンドリマーでは、二つめの β-CD が近接するために、濃度が低い状態でも CD-デンドリマー中の二つの CD 部位による協同的包接が起こる。すなわち、CD の空孔が1分子内でより密集した状態にある CD-デンドリマーが ANS を効率よく包接する。二つの β-CD によって包接さ

Fig. 2 Fluorescence spectra of ANS. (a) ANS only; (b) β -CD + ANS; (c) CD-branched oligomer + ANS; (d) CD-dendrimer (G=1) + ANS; (e) CD-dendrimer (G=2) + ANS; (f) PAMAM dendrimer (G=2) + ANS; (g) β -CD + PAMAM dendrimer (G=2) + ANS. $[\text{ANS}] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\beta\text{-CD}] = 2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CD-branched oligomer}] = 6.8 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CD-dendrimer (G=1)}] = 4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CD-dendrimer (G=2)}]$ and $[\text{PAMAM dendrimer (G=2)}] = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

Fig. 3 Absorption spectra of AO-7. (a) AO-7 only; (b) β -CD + AO-7; (c) CD-branched oligomer + AO-7; (d) CD-dendrimer (G=1) + AO-7; (e) CD-dendrimer (G=2) + AO-7; (f) PAMAM dendrimer (G=2) + AO-7; (g) β -CD + PAMAM dendrimer (G=2) + AO-7. $[\text{AO-7}] = 5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\beta\text{-CD}] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CD-branched oligomer}] = 1.7 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CD-dendrimer (G=1)}] = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CD-dendrimer (G=2)}]$ and $[\text{PAMAM dendrimer (G=2)}] = 5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

れたANSは強い疎水的相互作用によって、蛍光が短波長側にシフトしたのではないかと考えられる。一方、 β -CD単独では、まず、ANSと1:1のホスト-ゲスト包接錯体を形成する。このとき、 β -CDはANSのアニリン残基を先に包接すると思われる。 β -CDが濃くなると、初めてナフタレンスルホン酸残基を協同的に包接して、2:1ホスト-ゲスト複合体を形成すると考えられる。

3.2 AO-7の吸収スペクトル

AO-7をゲスト分子、未修飾の β -CDあるいは各世代のCD-デンドリマーをホスト分子としたときの吸収スペクトルの変化をFig. 3Aに示す。AO-7は代表的な酸性アゾ染料の一つであり、484 nmにアゾ基の π - π^* 遷移に起因する吸収極大を持つ。CDに包接されたAO-7は芳香環の電子状態が変化し、可視光領域の吸収スペクトルが変化することが知られている¹¹⁾。

Fig. 3Aを見ると、 β -CDおよびCD-ブランチ・オリゴ

マーと比較して、第1世代、第2世代のCD-デンドリマーでは484 nmのピークの強度が低く、また、吸収帯のすそが長波長側にシフトしていることがわかる。AO-7をゲスト分子とし、第2世代PAMAMデンドリマー、第2世代CD-デンドリマー、または β -CDと第2世代PAMAMデンドリマーの混合物をホスト分子としたときの吸収スペクトルの変化をFig. 3Bに示す。第2世代PAMAMデンドリマーおよび混合物と比較して、第2世代CD-デンドリマーのスペクトルの変化が大ききことを確認することができた。以上の結果から、 β -CD、PAMAMデンドリマーあるいはそれらの混合溶液よりも、CD-デンドリマーのほうがAO-7を有効に包接することがわかった。おそらく、ANSと同様に、CD-デンドリマーでは2つの β -CDがAO-7のナフトール基とベンゼンスルホン酸基を協同的に包接したと予想される。ナフトールのOH基はアゾ基と分子内水素結合をしているので、 π - π^* 遷移に変

化をもたらしたのではないかと考えられる。

PAMAM デンドリマーは末端にアミノ基を有するので、その水溶液はアルカリ性を示す。また、CD-デンドリマーも約40%の未置換の末端アミノ基が残っているので、若干アルカリ性を示す。したがって、PAMAM デンドリマーと CD-デンドリマーの結果の違いが溶液の pH の違いによるものである可能性が考えられる。しかし、pH を 6, 7, 8 に調整した 0.1 M のリン酸緩衝液に AO-7 を加えて吸収スペクトルを測定してみたけれども、ほとんど変化は見られなかった。したがって、PAMAM デンドリマーと CD-デンドリマーを加えたときの AO-7 の吸収スペクトルの違いは pH による違いではなく、 β -CD で修飾した結果であることを確認することができた。

4. ま と め

本研究では、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリンを用いた脱水縮合反応によって、PAMAM デンドリマーの約60%のアミノ末端基に β -CD を導入することができた。ANS をゲスト分子として用いた包接実験では、新規に合成した CD-デンドリマーを添加すると、蛍光スペクトルが大きく変化した。また、 β -CD と PAMAM デンドリマーの混合溶液の結果と比較すると、CD-デンドリマーの蛍光スペクトルの変化の方が大きく CD-デンドリマーの包接能の向上を確認することができた。また、AO-7 をゲスト分子として用いたときにも、CD-デンドリマーの包接能の向上を確認することができた。最近、CD をコアにしたデンドリマーや^{12,13)}、デンドリマーの表面末端基に CD を結合させた 1 : 1 複合体など¹⁴⁻¹⁷⁾が報告されている。デンドリマーと CD の機能を組みあわせた研究が、今後、ますます、発展すると予想される。

謝辞

貴重なご意見を頂戴した東京農工大学大学院生物システム応用科学研究所の高柳正夫先生および荻野賢司先生に感

謝する。また、スペクトルの測定などご指導を賜った工藤聡博士、橋本千尋博士に感謝する。

参 考 文 献

- 1) D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, and P. Smith: *Polym. J.* **17**, 117 (1985).
- 2) D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, and P. Smith: *Macromolecules* **19**, 2466 (1986).
- 3) D. A. Tomalia and J. R. Dewald: U. S. Patent 4587329 (1986).
- 4) K. Aoi, K. Itoh, and M. Okada: *Macromolecules* **28**, 5391 (1995).
- 5) C. Kojima, K. Kono, K. Maruyama, and T. Takagishi: *Bioconjugate Chem.* **11**, 910 (2000).
- 6) T. W. Ebbesen and C. A. Ghiron: *J. Phys. Chem.* **93**, 7139 (1989).
- 7) A. Harada, M. Furue, and S. Nozakura: *Macromolecules* **10**, 676 (1977).
- 8) A. Harada, M. Furue, and S. Nozakura: *Polym. J.* **12**, 29 (1980).
- 9) Y. Liu, C.-C. You, and B. Li: *Chem. Eur. J.* **7**, 1281 (2001).
- 10) Y. Liu, Y. Chen, B. Li, T. Wada, and Y. Inoue: *Chem. Eur. J.* **7**, 2528 (2001).
- 11) N. Yoshida, H. Yamaguchi, T. Iwao, and M. Higashi: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 379 (1999).
- 12) G. R. Newkome, L. A. Godínez, and C. N. Moorefield: *Chem. Commun.* 1821 (1998).
- 13) A. Vargas-Berenguel, F. Ortega-Caballero, F. Santoyo-González, J. J. García-López, J. J. Giménez-Martínez, L. García-Fuentes, and E. Ortiz-Salmerón: *Chem. Eur. J.* **8**, 812 (2002).
- 14) J. Suh, S. S. Hah, and S. H. Lee: *Bioorg. Chem.* **25**, 63 (1997).
- 15) I. Baussanne, J. M. Benito, C. O. Mellet, J. M. G. Fernández, H. Law, and J. Defay: *Chem. Commun.* 1489 (2000).
- 16) H. Arima, F. Kihara, F. Hirayama, and K. Uekama: *Bioconjugate Chem.* **12**, 476 (2001).
- 17) 松岡浩司, 斎藤洋介, 照沼大陽, 葛原弘美: *高分子論文集* **57**, 691 (2000).