

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390010

研究課題名 (和文) グルコース応答性ナノカプセルの高機能化

研究課題名 (英文) High-performance glucose-sensitive nanocapsules

研究代表者

安齋 順一 (ANZAI JUN-ICHI)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：40159520

研究成果の概要 (和文)：グルコース濃度を計測するためのナノカプセルおよびグルコースに応答してインスリンを放出するナノカプセルの開発を実施した。まず、これらのナノカプセルを作製するための材料とレクチン複合体およびインスリンの封入方法を確立した。すなわち、レクチン複合体またはインスリンを封入した微粒子の表面を薄膜で被覆した後に、微粒子を溶解させてナノカプセルを作製することに成功した。これらのナノカプセルは、グルコースの検出およびグルコースに応答したインスリンの放出に有用であることを見出した。

研究成果の概要 (英文)：The development of nanocapsules for glucose determination and for release insulin in response to enhanced glucose level have been studied. CaCO_3 nanoparticles containing lectin complexes or insulin were coated with polyelectrolyte thin films followed by dissolution of the nanoparticle, resulting in nanocapsules. The nanocapsules thus prepared were successfully used for glucose determination and for insulin release in response to enhanced glucose level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：グルコース、ナノカプセル

1. 研究開始当初の背景

高分子交互累積膜法によるマイクロカプセルおよびナノカプセルの調製と機能開発が世界の数グループにより検討されており、研究に参入するグループの数も増加している。しかし、これらのナノカプセルは工学的応用

を目的としたものが多く、薬学や生命科学領域への利用を目的とした例は多くはない。特に、グルコースの生体計測に利用されるナノカプセルやインスリン DDS を目的としたグルコース応答ナノカプセルの成功例はいまだ報告されておらず、喫緊の研究課題である。

研究代表者らはこれまでに、タンパク質や合成高分子を材料として用いた交互累積法によるナノ薄膜の開発とバイオセンサー等への応用に関して研究を重ねてきた。とりわけ、グルコース応答性薄膜の開発とグルコースセンサーへの応用に関して多くの研究成果を達成してきた。その結果、ナノ薄膜の DDS 利用にも目途がつき、これらの研究をさらに発展させるために、本研究においてグルコースの生体計測およびインスリン DDS を目的としたグルコース応答性ナノカプセルの開発を企画した。

2. 研究の目的

本研究では、以下の示す 2 種類のグルコース応答性ナノカプセルを開発する。すなわち、1) ナノカプセル型グルコースセンサー、および 2) インスリン放出ナノカプセル、の 2 種類である。前者はグルコースの生体計測に用いるものである。研究代表者らはこれまでに、レクチンとグリコゲン複合体を用いたグルコースを検出する蛍光センサーを実現しているが、本研究ではこの蛍光センサーをカプセル化する。これにより、細胞や組織内のグルコース濃度の分布を把握することが可能となる。また、後者のナノカプセルにはインスリンを封入して、グルコースレベルの上昇時にカプセルが分解することによりインスリンが放出されるナノシステムを確立する。ナノカプセルの作製には交互累積膜法を採用する。

3. 研究の方法

ナノカプセル型グルコースセンサーに関しては、これまでの研究で封入するレクチンとグリコゲン複合体の物性や特性は把握済みなので、19 年度からただちにカプセルの調製と性能評価を実施した。また、インスリン放出ナノカプセルに関しては、19 年度にインスリン封入方法などの予備的検討を実施したうえで、次年度からナノカプセルへのインスリンの封入と性能評価を実施した。

ナノカプセルグルコースセンサーを作製するために、まず蛍光標識したレクチンとグリコゲンの複合体を炭酸カルシウム粒子に内包させて、その粒子表面を正および負の高分子電解質を交互に吸着させた累積膜で被覆した。その後、EDTA 溶液に浸して炭酸カルシウムを溶解させることにより、レクチンとグリコゲンの複合体を封入した空洞のナノカプセルとした。意図するナノカプセルが作製されたことを電子顕微鏡および蛍光顕微鏡により確認した。次に、作製したナノカプセルを 1~20mM 程度のグルコース溶液に浸して、ナノカプセルから発する蛍光の強度がグルコース濃度にどのように依存するか検討した。ナノカプセルを作製する際には、カ

プセル内に封入するレクチンとグリコゲンの複合体の含量の調整、カプセル皮膜とする高分子材料の種類および皮膜の厚さの検討、カプセルの保存法、洗浄法、再使用法、などについての最適化等を行った。

インスリン放出ナノカプセルの研究は、はじめにインスリンを炭酸カルシウム粒子へ封入する方法の最適化を行った。すなわち、封入時のインスリン濃度、粒子調製溶液の濃度や pH、調製時の攪拌速度や時間、等の諸条件を詳細に検討した。次に、インスリン内包炭酸カルシウム粒子の表面へ交互累積膜を被覆して、その後に EDTA 溶液に浸して炭酸カルシウムを溶解させることにより、インスリンを封入したナノカプセルとした。ナノカプセルの膜材料として、グルコース応答性を付与するために、レクチン (Con A) を用いた。さらに、糖結合性を示す合成高分子の使用も実施した。また、これら種々の材料を用いた累積膜の性質を調べる目的で、平面基板へ累積膜を作製して分光法やマイクロバランス法など各種の方法による検討も同時に実施した。次に、作製したインスリン封入ナノカプセルをグルコース溶液に曝露した際に、ナノカプセル内からインスリンが放出される速度と量の測定を行って、ナノカプセルの性能評価を実施した。

4. 研究成果

フルオロセインで蛍光標識したレクチンとグリコゲンの複合体を炭酸カルシウム粒子に内包し、粒子表面を正および負の高分子電解質を交互に吸着させた累積膜で被覆した後、EDTA 溶液に浸して炭酸カルシウムを溶解させることにより、レクチン・グリコゲン複合体を封入したナノカプセルが作製できることが明らかになった。蛍光標識レクチンとグリコゲンはナノカプセル内で巨大なサイズの複合体を形成しているためにナノカプセル内に固定化され、外部に漏出することはなかった。この状態では、フルオロセインに由来する蛍光の強度は著しく抑制された。これは、複合体を形成することにより蛍光が消光されたことによると考えられる。一方、ナノカプセルを分散した溶液に糖が添加されると、消光が解消されて蛍光強度が増大することが見出された。蛍光強度は糖の濃度依存的に増大することがわかったので、糖の定量検出に有効である。しかし、糖が存在するときには糖とレクチンが結合するためにグリコゲンから解離し複合体が分解されて、レクチンが単量体になるためにサイズが低下してナノカプセルから漏出した。そのため、作製したナノカプセルを糖の検出に用いることが可能であるが、繰り返し使用には限度があることがわかった。この問題に対処するために、ナノカプセルの膜を架橋して漏出を

低下させることなどを検討したが、現時点で有効な手段が確立されていない。

次に、インスリン放出ナノカプセルの作製について基礎的な情報を得る目的で、インスリン含有交互累積膜を作製して物性を検討した。インスリンは pH に応じて分子表面に正または負の電荷を有することを利用して、適当な高分子電解質を用いてインスリン含有交互累積膜が調製できることが明らかになった。酸性溶液中で正に帯電したインスリンとポリビニル硫酸やデキストラン硫酸を用いて交互累積膜とし、中性溶液に浸すと交互累積膜が分解してインスリンが放出されることが見出された。この交互累積膜は酸性溶液中でタンパク質分解酵素（ペプシン）に対して安定であることも明らかになり、インスリン経口剤の材料候補として有用であることが示唆された。また、中性溶液中で負に帯電したインスリンとポリアリルアミンを用いて交互累積膜としたときは、弱酸性溶液に浸すと交互累積膜が分解してインスリンが放出されることもわかった。このようなインスリン含有交互累積膜はポリ乳酸微粒子表面へも被覆することが可能であった。

次に、インスリン封入ナノカプセルの調製を行い、レクチンを用いて作製したナノカプセルからグルコースに応答してインスリンが放出されることがわかった。また、合成高分子（フェニルボロン酸修飾高分子）を用いてもインスリン封入ナノカプセルを調製することに成功した。糖が共存しないときにはナノカプセルからのインスリンの漏出はわずかであったが、糖が添加されるとインスリンの放出が著しく促進された。これはナノカプセル壁に存在するフェニルボロン酸残基に糖が共有結合することにより、ナノカプセルが不安定化または分解することによると推定される。すなわち、本研究で当初目的としたグルコース応答ナノカプセルの作製に成功した。しかし、このインスリン封入ナノカプセルの糖に対する応答は pH 9 で観察されたが、生理条件に近い pH 7～8 では応答が低く、満足すべき結果が得られていない。また、応答性は糖の種類に依存しており、フルクトースでは高い応答性を示したが、グルコースでは応答性は低かった。今後、pH 7～8 において 10 mM 程度の濃度のグルコースに反応してインスリンが放出されるナノカプセルへと改善することが必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Katsuhiko Sato, Tatsuya Nakajima, Yu Yasukawa, Jun-ichi Anzai,

Sugar-dependent solubility and fluorescence property of copolymers consisting of phenylboronic acid and 2-hydroxyethyl methacrylate moieties, 査読有, Polymer Bulletin, 印刷中 (2010).

- ② Kentaro Yoshida, Katsuhiko Sato, Jun-ichi Anzai, Layer-by-layer polyelectrolyte films containing insulin for pH-triggered release, 査読有, Journal of Materials Chemistry, 20, 1546-1552 (2010).

- ③ Katsuhiko Sato, Jun-ichi Anzai, Jiadong Huang, Qiang Chen, Layer-by-layer thin films containing proteins for biosensor applications, 査読無, Bottom-up Nanofabrication, 5, 219-233 (2009).

- ④ Shigeru Tomita, Katsuhiko Sato, Jun-ichi Anzai, Preparation of dendrimer-loaded microcapsules by a layer-by-layer deposition of polyelectrolytes, 査読有, Materials Science and Engineering C, 29, 2024-2028 (2009).

- ⑤ Yuya Egawa, Ryota Gotoh, Toshinobu Seki, Jun-ichi Anzai, Sugar response of boronic acid-substituted azobenzene dye-modified polymer, 査読有, Materials Science and Engineering C, 29, 115-118 (2009).

- ⑥ Katsuhiko Sato, Daisuke Kodama, Yoshihiro Endo, Jun-ichi Anzai, Preparation of insulin-containing microcapsules by a layer-by-layer deposition of concanavalin A and glucose, 査読有, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 9, 386-390 (2009).

- ⑦ Shigeru Tomita, Katsuhiko Sato, Jun-ichi Anzai, Layer-by-layer assembled thin films composed of carboxyl-terminated poly(amidoamine) dendrimer as a pH-sensitive nano-device, 査読有, Journal of Colloid and Interface Science, 326, 35-40 (2008).

- ⑧ Kentaro Yoshida, Hiroshi Sato, Shigehiro Takahashi, Jun-ichi Anzai, Preparation of layer-by-layer thin films containing insulin and its pH-sensitive decomposition, 査読有, Polymer Journal, 40, 90-91 (2008).

- ⑨ 王 保珍、江川祐哉、佐藤勝彦、安齋順二、交互累積法によるナノ薄膜およびナノカプセルを用いたバイオセンサ、マテリアルインテグレーション、査読無、21,

〔学会発表〕(計 19 件)

- ① Jun-ichi Anzai, Sugar-sensitive films and microcapsules for sensing and release, 8th Asian Conference on Chemical Sensors, 2009年11月15日、Daegu
- ② Kentaro Yoshida, Jun-ichi Anzai, pH- or glucose-sensitive thin films and microcapsules containing insulin, 8th Asian Conference on Chemical Sensors, 2009年11月15日、Daegu
- ③ 吉田健太郎、安齋順一、刺激応答性インスリン放出システムの開発、第48回日本薬学会東北支部大会、2009年10月18日、仙台
- ④ 安齋順一、糖存在下におけるフェロセンボロン酸の電気化学応答、第48回日本薬学会東北支部大会、2009年10月18日、仙台
- ⑤ 佐藤勝彦、安齋順一、グルコースセンサ機能をもつインスリンカプセル、第48回化学センサ研究発表会、2009年9月10日、東京
- ⑥ 吉田健太郎、安齋順一、pH応答性インスリン含有カプセルの開発、みちのく分析科学シンポジウム2009、2009年7月25日、仙台
- ⑦ 保科 直、安齋順一、グルコースオキシダーゼを固定化した微粒子およびカプセルの糖応答性の評価、みちのく分析科学シンポジウム2009、2009年7月25日、仙台
- ⑧ 吉田健太郎、安齋順一、pH応答性インスリン含有マイクロカプセルの調製、日本薬学会第129年会、2008年3月28日、京都
- ⑨ Kentaro Yoshida, Jun-ichi Anzai, Insulin-containing thin films and nano-particles for glucose-triggered controlled release, The 3rd International Symposium on Environmental Economy and Technology, 2008年8月26日、深谷
- ⑩ Satoshi Niina, Jun-ichi Anzai, Sugar-sensitive thin films composed of phenylboronic acid-modified dendrimers, The 3rd International Symposium on Environmental Economy and Technology, 2008年8月26日、深谷
- ⑪ 新名 聖、安齋順一、フェニルボロン酸修飾 dendrimer とポリビニルアルコールを用いた糖応答性薄膜、みちのく分析科学シンポジウム2008、2008年7月19日、仙台
- ⑫ 佐藤勝彦、安齋順一、コンカナバリンAを用いたマイクロカプセルの調製と糖応答性、第69回分析化学討論会、2008年5月15日、名古屋
- ⑬ 児玉大祐、安齋順一、糖類の刺激でインスリンを放出するマイクロカプセルの調製、日本薬学会第128年会、2008年3月28日、横浜
- ⑭ 遠藤好弘、安齋順一、交互累積方により作製したマイクロカプセルの透過性、日本薬学会第128年会、2008年3月28日、横浜
- ⑮ Shigehiro Takahashi, Jun-ichi Anzai, Insulin nano-films sensitive to pH and glucose, 7th East Asia Conference on Chemical Sensors, 2007年12月3日、シンガポール
- ⑯ 吉田健太郎、安齋順一、インスリンを含有する交互累積膜の調製と性質、2007 高分子学会東北支部研究発表会、2007年11月15日、秋田
- ⑰ 児玉大祐、安齋順一、レクチンを構成成分とするマイクロカプセルの糖応答性、みちのく分析科学シンポジウム2007、2007年7月27日、仙台
- ⑱ 吉田健太郎、安齋順一、インスリン累積膜の調製とpH応答性、みちのく分析科学シンポジウム2007、2007年7月27日、仙台
- ⑲ 安齋順一、交互累積膜によるナノ薄膜・ナノカプセルの機能開発、みちのく分析科学シンポジウム2007、2007年7月27日、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安齋 順一 (ANZAI JUN-ICHI)
 東北大学・大学院薬学研究科・教授
 研究者番号：40159520

(2) 研究分担者

佐藤 勝彦 (SATO KATSUHIKO)
 東北大学・大学院薬学研究科・助教
 研究者番号：80400266

(3) 連携研究者

()

研究者番号：