

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550074

研究課題名（和文） シグナル増幅機能を内蔵した新規グルコースセンシングマイクロカプセルの開発

研究課題名（英文） Development of novel glucose sensing capsules with a function of signal enhancement

研究代表者

遠田 浩司 (TOHDA KOJI)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授

研究者番号：60212065

研究成果の概要（和文）：低侵襲的に間質組織中のグルコースをモニターするシステムの構築を目指した、シグナル増幅機能を内蔵する新規膜透過性制御型グルコースセンシングマイクロカプセルの開発のための研究を行った。まず、センサー応答の定式化を行い実験的に検証した。次に、皮下埋め込み型センサー用近赤外色素を設計・合成した。更に微粒子を乳化重合法により調製し、これに酵素および近赤外色素を固定化した後、ポリカチオンとポリアニオン溶液で処理し5層の被覆膜を有するセンシングカプセルを構築した。このセンシングカプセルはグルコースに対し可逆的かつ迅速な応答を示した。

研究成果の概要（英文）：In order to develop a minimally invasive sensor system for *in vivo* monitoring of glucose in interstitial fluid, glucose sensing micro-capsules with a function of signal enhancement based on the regulation of transport of enzymatic products across the capsule membranes had been fabricated and their response properties were investigated. At first, a theoretical model describing signal-enhancement functions of the sensing capsule was proposed and experimentally verified. Second, novel near-infrared dyes were designed and synthesized as a sensory element of implantable optical glucose sensors. Finally, a fabrication method of glucose sensing micro-capsules was established. Accordingly, microspheres having amino moieties as immobilizing sites were prepared using an emulsion polymerization method. After immobilizing enzyme glucose oxidase and the dye, the microspheres were covered with five layers of polycation/polyanion using a layer-by-layer method. The thus prepared glucose sensing micro-capsules showed rapid and reversible color responses for glucose.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：バイオセンサー、オプティカル酵素センサー、微粒子カプセル、近赤外吸収色素

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病患者は血糖値管理のため一日数回指先から採血し外部の装置で血糖値を測定しなければならない。しかし血糖値は食前食後で急激に変動するので採血による血糖値管理では充分でなく合併症のリスクが大きくなる。従って、血糖値を連続的に測定できる信頼性の高いシステムの開発が切望されてきた。最近、血糖値を連続的にモニターできる電気化学センサーが市販されたが、これは針状の電極を皮膚に突き刺して使用するため、患者に不快感を与えるとともに皮膚を横切るワイヤーのため感染症を引き起こす等の問題があり、三日以上の装着はできない。

(2) 近年グルコース酸化酵素と蛍光色素を組み合わせたかたちの低侵襲グルコースモニタリングを目指したセンサーの開発研究がいくつか報告されている。例えば McShane らは、マイクロメーターサイズのシリカにグルコース酸化酵素と蛍光色素を含浸させたかたちのセンシングビーズを開発している。彼らは皮膚を切開しこのセンシングビーズを埋め込むことによって、間質組織中のグルコース濃度に応じて蛍光強度が変化する“スマート刺青”の開発を目指している(E. W. Mcshane, et al., Anal. Chem. 2008, 80 1408)。しかしこれらのセンサーは、酵素反応による酸素の消費に伴う蛍光色素のクエンチングの解消を光学的検出原理としているため、膜透過性制御に基づいたシグナル増幅能を付加することは不可能であり、また、蛍光検出のため比較的複雑な検出系が必要となり、組織からの自己蛍光の影響も受ける。

(3) 我々はこれまで、低侵襲的に血糖値を連続的にモニターするシステムの構築を目指して、皮下埋め込み用微小グルコースセンサーの開発研究を行ってきた。これは、グルコース濃度変化に対して可逆的に色変化(吸収スペクトル変化)をもたらす微小センサーが開発できれば、これを皮膚直下の間質組織に埋め込むことによって、グルコース濃度の変化を、皮膚を介したセンサーの色変化として検出するシステムが構築できると考えたからである。この場合、蛍光検出法と比べて、励起光源等の光学的制約が少なく適当な光源があればセンサーの“色”を検出でき、またセンサーの色変化が明瞭であれば目視でリアルタイムの血糖値を確認できる。

(4) これまでに我々が試作した極小型グルコースセンサーは、グルコース酸化酵素固定化ビーズと酵素反応による局所的 pH 変化に応じて色が変わる機能性色素含有ビーズをタブレット状の透明なカプセル薄膜中に封

じ込めたものである。我々は、グルコースおよび酵素反応生成物であるグルコン酸の透過性の異なった種々のカプセル膜を合成し、*in vitro* でのグルコースに対する応答を評価した結果、グルコン酸のみに対して透過性を制御したカプセル膜に基づくセンサーが、グルコースに対して極めて鮮明な色変化応答を示すことを見いだした。これは、カプセル膜のグルコン酸透過性を抑制することで、カプセル内でグルコン酸が濃縮されたためである。

(5) しかし、これまで試作したセンサーがサブミリメートルのディメンションであるため、グルコン酸の膜透過性を抑制する程、センサーの感度は上昇するものの応答時間が数十分のオーダーで長くなり、実用的とはいえない。グルコン酸の高濃縮を達成しながら応答時間を短縮するには、センサーのサイズを微細にする必要がある。そこで、メゾスケールの膜透過性制御型グルコースセンシングマイクロカプセルを開発することに思い至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、カプセル膜透過性制御によるグルコン酸濃縮効果に基づいた、迅速かつ極めて鋭敏な色変化応答を示すメゾスケールのグルコースセンシングカプセルを開発することである。これは直径  $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$  程度の微粒子を合成し、これに pH に応じてその吸収スペクトルが鋭敏かつ明瞭に変化する機能性色素とグルコース酸化酵素を固定化し、グルコン酸の透過性を制御するカプセル膜で覆うことによって構築する。そのために、まずセンシングカプセルの核となり、色素および酵素固定化の担体となる微粒子の合成法を確立することを目標とする。次に、色素及び酵素の微粒子への固定化法を確立することを目標とする。種々の二種官能基性のスパーサーを色素及び酵素に導入し、微粒子への固定化収率が最高になる系を見つける。また、pH 変化に対して鋭敏に色変化する機能性色素の開発も行なう。更に、グルコン酸の透過性を制御するカプセル膜の構築法を確立することを目標とする。酵素-色素担持微粒子を、グルコン酸と静電的相互作用をするポリアニオン、ポリカチオンあるいはその組み合わせのカプセル膜で覆い、グルコースに対する *in vitro* での応答感度、再現性、安定性について詳細に評価するとともに膜の透過性と感度の関係を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規近赤外吸収機能性色素の合成

図1に近赤外吸収機能性色素の合成スキームを示す。2,4-ジメチルピロールとテレフタル酸アルデヒドメチルエステルをジクロロメタンに溶解させ、酸触媒を加えて窒素雰囲気下で反応させた。ここに *p*-クロラニルを加え酸化反応を行った後、トリエチルアミンと三フッ化ホウ素を添加しピロメテンホウ素錯体 **1** を得た。

次に、ホウ素錯体 **1** と3-ニトロ-4-ヒドロキシベンズアルデヒドあるいは3-ブロモ-4-ヒドロキシベンズアルデヒドをトルエンに溶解させ、ピペリジンと酢酸を添加後、ディーンスターク蒸留管を用いて一晩加熱還流を行った。得られた混合物をカラムクロマトグラフィーで精製し、ボロンピロメセン色素 (BOBIPY) **2**, **3**, **4** を得た。

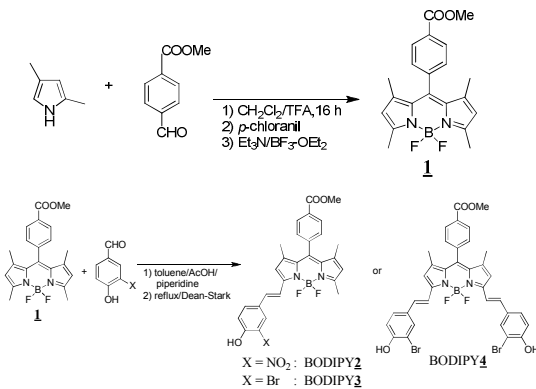


図1 BOBIPY 色素合成スキーム

#### (2) 酵素および色素固定化担体としての微粒子の合成

##### ①有機親水性微粒子の合成

アクリルアミド(AA)0.32g, ビスアクリルアミド(MBA)0.16g, アミノエチルメタクリレート(AEM)0.20g, 過硫酸アンモニウム(APS)0.02g を 3ml の PBS 緩衝溶液に溶解させ、これを水相とした。シクロヘキサン 47ml に分散剤としてビス(2-エチルヘキシル)スルホコハク酸ナトリウム(AOT)1.2g とポリオキシエチレンラウリルエーテル(Brij30)0.6g を溶解し、この有機相に水相を添加し超音波を照射して分散させた後、テトラエチルメチレンジアミン(TEMED)を添加して重合させた。反応後溶媒を留去し、限外ろ過装置を用いて洗浄した。合成した微粒子は低真空 SEM にて形状の観察を行った。

##### ②有機疎水性微粒子の合成

グリシジルメタクリレート(GMA)10ml, メチルメタクリレート(MM)70ml, エチレンジリコールジメタクリレート(EGDMA)10ml,

AIBN 1g を 0.4g のメチルセルロース(MC)を含む 1.5L の蒸留水に加え、500rpm で攪拌しながら 70°C で 7 時間反応させた後、限外ろ過装置を用いて洗浄を行った。得られたメチルメタクリレート微粒子 1g を、10ml の 1,2-ビス(2-アミノエトキシ)エタン(BAEE)を含む DMSO 溶液(10ml)に加え、60°C で 24 時間反応させることによって、固定化部位としてのアミノ残基を有する疎水性微粒子を得た。合成した微粒子の形状は、低真空 SEM を用いて観察した。

#### (3) 微粒子への酵素および色素の固定化とセンシングビーズの構築

##### ①BODIPY 色素の脱保護

合成した BODIPY **4** のエステル保護基を 1M NaOH H<sub>2</sub>O/THF(1:1)で処理し、BODIPY **4**-COOH を調製した。

##### ②色素と酵素の固定化

BODIPY **4**-COOH 50mg, カップリング試薬(DMT-MM)19mg を DMSO 2ml と PBS 緩衝溶液 2ml の混合溶媒に溶解させ、ここにメチルメタクリレートを主成分とし固定化部位としてアミノ残基を導入した有機疎水性微粒子 1g を加え、室温で一晩攪拌した後、蒸留水で洗浄し酵素固定化微粒子を得た。得られた微粒子を、グルコースオキシダーゼ(230unit) 50mg, DMT-MM 100mg を含む 4ml の PBS 緩衝溶液に加え、5°C で一晩放置した。得られた微粒子を蒸留水で洗浄し、色素/酵素固定化微粒子を得た。

#### (3) カプセル膜の構築

1mg/ml の濃度のポリエチレンイミン(PolyEI)水溶液に上述の色素/酵素固定化微粒子を加え、室温で 10 分間放置、遠心分離し、上澄み液を除去した後イオン交換水で洗浄した。この PolyEI で処理した微粒子を、1mg/ml の濃度のポリスチレンスルホン酸(PolySS)水溶液に加え、10 分間放置、遠心分離し上澄み液を除いた後、イオン交換水で洗浄した。この操作を複数回繰り返すことによって、色素/酵素固定化微粒子をポリカチオン/ポリアニオン膜で被覆した。

### 4. 研究成果

#### (1) 酵素に基づくオプティカルセンシングカプセルの応答機構のモデル化とその検証

我々の提案したシグナル増幅能を有するオプティカルグルコースセンシングカプセルは、試料中のグルコースがカプセル膜を介してカプセル内に拡散し、カプセル内で酵素反応を受け生成したグルコン酸によってカプセル内 pH が変化し、これによりカプセル内に封じ込めた機能性色素の色変化がもたらされるというものである。応答シグナルの増幅は酵素反応生成物であるグルコン酸のカ

プセル外への拡散が、カプセル膜によって抑制されるために生じるものと考えられる。そこでこのセンシングカプセルの応答機構を定量的に記述するために、センサー応答のモデル化を行った。図2にグルコースセンシングカプセルの応答モデルを示す。

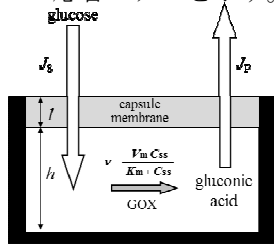


図2 グルコースセンシングカプセルの応答モデル

グルコースおよびグルコン酸のカプセル膜を横切る拡散流束 ( $J_s$ ,  $J_p$ ) 方程式と、カプセル内でのミカエリスメンテン型酵素反応速度式と組み合わせることによって、以下の微分方程式が得られる。

$$\frac{\partial Q_{P(t)}^{tot}}{\partial t} - \frac{\partial C_{P(t)}}{\partial t} = \frac{D_p}{hl} C_{P(t)}$$

ここで  $Q_{P(t)}^{tot}$  は、時間  $t$  までにカプセル内で生成したグルコン酸の総濃度、 $C_{P(t)}$  は時間  $t$  におけるカプセル内グルコン酸濃度、 $D_p$  はカプセル膜中でのグルコン酸の拡散係数である。この微分方程式をカプセル内グルコン酸濃度について解くと以下の式になる。

$$C_{P(t)} = \frac{hlV_m C_{SS}}{D_p(K_m + C_{SS})} + (C_{P(t=T)} - \frac{hlV_m C_{SS}}{D_p(K_m + C_{SS})}) \exp[-\frac{D_p(t-T)}{hl}]$$

ここで  $C_{SS}$  はカプセル内グルコースの定常濃度、 $T$  は定常濃度に達するまでの時間であり、以下の関係がある。

$$C_{SS} = \frac{1}{2} (C_S^0 - K_m - \frac{hlV_m}{D_s}) + \sqrt{C_S^0 K_m + \frac{(D_s(C_S^0 - K_m) - hlV_m)^2}{4D_s^2}}$$

ここで  $C_S^0$  は試料溶液中グルコース濃度、 $D_s$  はカプセル膜中でのグルコースの拡散係数である。図3に、この応答モデルに基づき計算した、カプセル中グルコン酸濃度と時間及びカプセル膜中のグルコン酸の拡散係数の関係を示す。

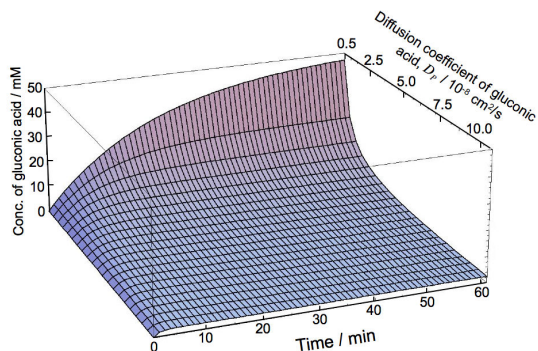


図3 応答モデル計算によるカプセル内グルコン酸濃度

計算結果より、カプセル膜中のグルコン酸拡散係数が小さくなると、応答時間は長くなるものの、カプセル内グルコン酸濃度が飛躍的に増加し、センサー応答が増幅されることが分かった。

そこでこの応答モデルを実験的に検証するために、カプセル膜の透過性の異なる3種類のグルコースセンシングカプセル (sensor1~3) を試作し、そのグルコースに対する応答からカプセル内グルコン酸濃度を見積もることにより、応答モデルとの比較を行った。図4にその結果を示す。いずれのセンサーも実測値とモデルによる計算値の良い一致が見られ、応答モデルによって実際のセンサー応答が記述できることが分かる。このモデル計算により、センシングカプセルのシグナル増幅能を増大させるためにはカプセル膜を介したグルコン酸の透過性を制御すればよく、また、カプセル内体積とカプセル膜厚を小さくすることにより、シグナル増幅能は維持されたままで応答時間が短くなることが分かった。

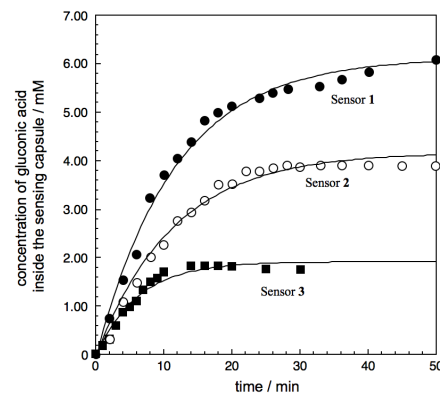


図4 膜透過性の異なるセンシングカプセルのグルコースに対する時間応答 (プロット: 実測値, 実線: モデル式による計算値)

## (2) 新規近赤外吸収機能性色素の特性評価

オプティカルグルコースセンシングカプセルを皮膚直下に埋め込み、間質組織液中のグルコース濃度の情報をセンシングカプセルの色の変化として、皮膚を介して連続的にモニターするためには、センサーの色変化の領域が皮膚組織による光学的妨害の少ない近赤外領域にあることが望ましい。そこで我々は光化学的に比較的安定なボロンジピロメセン骨格を持ち、センシングカプセルの核となる微粒に固定化するためのカルボキシル基とグルコン酸濃度により光学的特性が変化するフェノール部位を併せ持つ色素 (BODIPY **2**, **3**, **4**) を設計・合成し、その光学的特性の評価を行った。

BODIPY **2** は、ピロメテン骨格 **1** にニトロフェニル部位を一つ導入したもので、中性 pH 域での最大吸収波長は 610nm であり近赤外波長域に達さない。また、pKa は 4.5 であり、



間質組織液の pH 値より遥かに小さく、グルコースセンシングカプセル用色素には適さない。そこで、ニトロ基よりも電子吸引性が小さい臭素を導入したブロモフェニル部位を一つ含む BODIPY **3** を合成し、その特性の評価を行った。

合成した BODIPY **3** の pKa は 5.8 であり、センシングカプセル用色素としては適切であった。しかし、残念ながら中性 pH 域での最大吸収波長は 625nm であり、近赤外波長領域には届かなかった。

そこで、色素の共役系を伸ばし、吸収波長を長波長側にシフトさせるため、ピロメテン骨格に二つのブロモフェニル部位を導入した BODIPY **4** を合成した。BODIPY **4** の pH に対する吸収スペクトル変化を図 5 に示す。BODIPY **4** の pKa1 は 5.7, pKa2 は 6.2 であり、生理的 pH 条件下で、酵素反応により生成したグルコン酸によって大きく吸収スペクトルが変化する。また、最大吸収波長は 740nm と近赤外域であり、皮下埋め込み型センサー用機能性色素としては最適なもののひとつである。

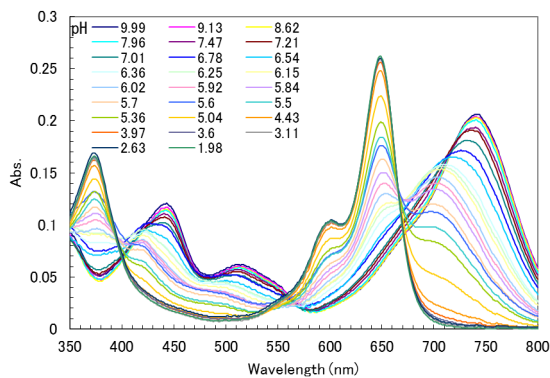


図 5 BODIPY **4** 溶液の各 pH における吸収スペクトル

### (3) グルコースセンシングマイクロカプセルの構築と評価

グルコースセンシングマイクロカプセルの構築スキームを図 6 に示す。

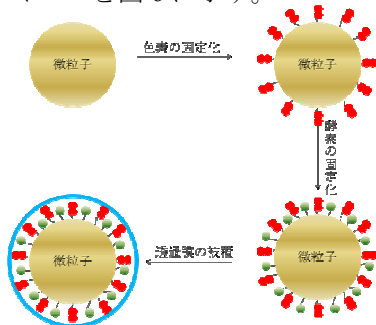


図 6 グルコースセンシングマイクロカプセルの構築スキーム

まず、センシングカプセルの核となる、固定化サイトとしてのアミノ残基を導入した微粒子を調製し、これに機能性色素と酵素であるグルコースオキシダーゼを固定化し、さらに layer-by-layer 法を用いて色素/酵素固定化

微粒子をポリカチオン/ポリアニオンで被覆することによりセンシングカプセルを構築した。

図 7 に逆乳化重合法を用いて調製したポリアクリルアミドを主構成成分とする有機親水性微粒子の低真空 SEM 画像を示す。この逆乳化重合法により、主に 1~2μm 程度のほぼ球形の微粒子を調製することができた。調製した親水性微粒子に機能性色素を固定化し、pH に対する色変化応答を測定した結果、10 秒程度の応答時間で迅速かつ可逆的に応答することが分かった。

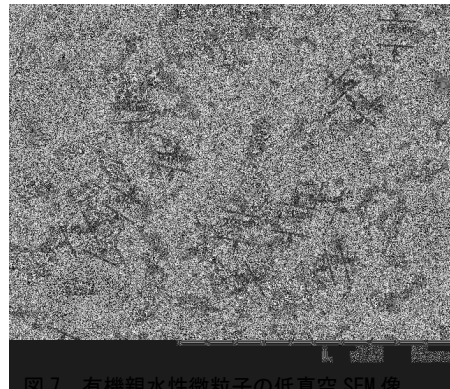


図 7 有機親水性微粒子の低真空 SEM 像

一方、分散重合法で調製した有機疎水性微粒子は、ほぼ球形の粒子が得られたが、その粒径は 60~80μm と大きく、本研究の目指すマイクロカプセルの核としては適さなかった。

調製した微粒子にカップリング試薬を用いて BODIPY **4** 色素と酵素であるグルコースオキシターゼを固定化し、layer-by-layer 法でポリカチオン/ポリアニオンを交互に被覆し、グルコースに対する色変化応答を測定した。その結果、ポリアニオン/カチオン被覆層が 3 層までのセンシングマイクロカプセルはグルコースに対する明瞭な色変化応答は見られなかったが、5 層~7 層被覆したセンシングカプセルはグルコースに対して可逆的な色変化応答を示した。図 8 にポリアニオン/カチオンを 5 層被覆したセンシングマイクロカプセルの典型的なグルコースに対する応答を示す。

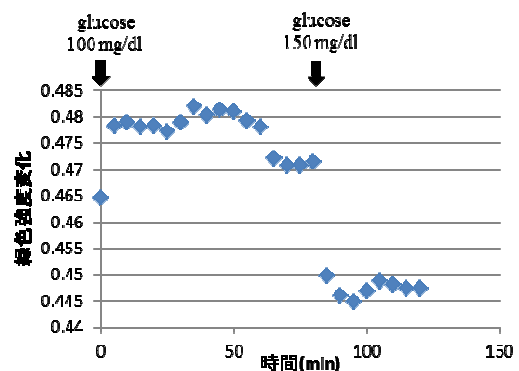


図 8 センシングマイクロカプセルのグルコースに対する応答

グルコースに対する応答時間は2分程度であり、以前我々が試作したサブミリメートルサイズのオプティカルグルコースセンシングカプセルの応答時間の十分の一程度と、迅速な応答を示している。これは、センシングマイクロカプセル内の体積が極めて小さいため、カプセル内グルコン酸濃度が迅速に定常濃度に達しているためと考えられる。

今後は構築したセンシングマイクロカプセルを生体適合性ハイドロゲルマトリクス中に分散・包括したチップを作製し、これを被検動物の皮膚直下に埋め込み、生体中でグルコース濃度の連続モニタリングが可能であるかどうか検証してゆく予定である。

## 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 4 件)

① Koji Tohda, Tatsuya Yamamoto, Miklos Gratzl, “Modelling the response function of enzyme-based optical glucose-sensing capsules” *Supramolecular Chemistry*, 査読有り, 26, 2010, 425-433.

[学会発表] (計 25 件)

① 遠田浩司, オプティカル糖センサー開発の展開, 日本分析化学会第 60 年会化学センサー研究懇談会(招待講演), 2011 年 9 月 16 日, 名古屋大学

② 遠田浩司, 植村宗佑, シグナル増幅能を内蔵するオプティカルグルコースセンシングカプセルの開発, 日本分析化学会第 60 年会, 2011 年 9 月 16 日, 名古屋大学

③ 遠田浩司, 安田祭花, 酵素に基づくオプティカルグルコースセンシングフィルムの開発研究, 日本分析化学会第 60 年会, 2011 年 9 月 16 日, 名古屋大学

④ 遠田浩司, 五嶋紀之, 小坂朋世, An optical sugar sensing film based on competitive binding between boronic acid receptor and functional dye immobilized on hydrogel matrix, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011, 2011年5月24日, 京都国際会館

⑤ 遠田浩司, 植村宗佑, 安田祭花, Enzyme-based optical glucose sensors with rapid and enhanced responses, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011, 2011年5月24日, 京都国際会館

⑥ 遠田浩司, 北川文隆, 飯野貴充, An optical sugar sensing solvent polymeric membrane based on lipophilic boronic acid receptor and chromoionophore, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011, 2011年5月24日, 京都国際会館

⑦ 遠田浩司, An optical sugar sensing film based on competitive binding between boronic acid receptor and functional dye immobilized on hydrogel matrix, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010年12月19日, ホノルル, ハワイ州, 米国

⑧ 遠田浩司, 小坂朋世, 機能性色素とボロン酸を固定化した糖センシングフィルムの開発, 日本分析化学会第59年会, 2010年9月16日, 東北大学

⑨ 遠田浩司, 谷田勇人, ヒドロキシメチルフェニルボロン酸に基づく糖レセプターの開発, 日本分析化学会第59年会, 2010年9月16日, 東北大学

⑩ 遠田浩司, 小坂朋世, 競争的錯形成反応を利用した色素/ボロン酸固定化糖センシングフィルムの開発, 日本分析化学会第58年会, 2009年9月25日, 北海道大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠田 浩司 (TOHDA KOJI)  
富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授  
研究者番号：60212065

### (2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者 ( )

研究者番号：