

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790031

研究課題名 (和文) LBL ミクロカプセルを用いた人工膵臓の開発

研究課題名 (英文) Development of artificial pancreas based on an LBL microcapsule

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文)：本研究では、糖類に応答し内部のインスリンを放出するミクロカプセル (人工膵臓) を、アルギン酸とフェニルボロン酸修飾ポリアリルアミンをインスリンを含有する CaCO_3 粒子の表面に積層し、その後 EDTA によって CaCO_3 を溶解除去することで調製した。糖類によるインスリンの放出はカプセル膜の崩壊に基づいており、添加された糖類が競合的に LBL カプセル膜中のフェニルボロン酸と結合したために引き起こされたと考えられる。

研究成果の概要 (英文)：Sugar-sensitive microcapsules containing insulin (artificial pancreas) were prepared by a layer-by-layer (LBL) deposition of alginic acid and phenylboronic acid-modified poly(allylamine) on the surface of a calcium carbonate (CaCO_3) microparticle in which insulin had been embedded, followed by dissolution of the CaCO_3 core. The sugar-triggered release of insulin was explained on the basis of decomposition of the microcapsules, which in turn was caused by competitive binding of added sugar to the phenylboronic acid moieties in the LbL film.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,420,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,920,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ミクロカプセル, インスリンDD, 機能性薄膜, 交互累積膜, フェニルボロン酸

1. 研究開始当初の背景

本研究では微粒子表面にポリマー材料を交互に被覆してミクロカプセルを調製する方法 (LBL 法) を用いた。この方法は、数年前から世界中で研究されるようになったが、本研究のように応答機能をもつカプセルの開発はほとんど報告例がなく、また医薬製剤への利用を明確に視野に入れた研究もほとんどないのが現状であった。例外として、2006 年と 2008 年にブドウ糖応答カプセルの

研究例が 2 例報告されていたが、これらはアルカリ性でのみ機能するもので、医薬への適用は不可能であった。

一方、インスリンの微粒子化やカプセル化の研究は国内外で種々検討されているが、その殆どは従来のカプセル化法 (液中硬化法、界面重合法、など) に依拠するものであり、申請者の方法とは全く異なる。これら国内外の研究は、多糖類などの生体適合材料の使用や動物を使った in vivo 性能の検討が主で、

分子設計に基づいて構造や機能を制御しようとする観点からの研究はなかった。一方で、申請者らの方法はいわゆる「ボトムアップ」方式によるカプセル作製法であり、高性能カプセルを開発するための設計指針を確立することが可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病治療薬インスリンをマイクロカプセル（直径1～10ミクロン）に封入し、ブドウ糖濃度が上昇したときにカプセルからインスリンが放出される「人工膵臓」を開発することを目的に研究を行った。

本邦の糖尿病患者は700万人を越えるとされており、効果的な薬物治療は重要な課題である。現在、治療薬としてインスリンが用いられるが、日常的に患者自身で頻繁に注射しなければならず、患者のQOLを向上させるために、インスリンの投与方法の改善が強く望まれていた。このような要求から、ブドウ糖の濃度が上昇したときにだけインスリンを放出する「人工膵臓」の開発が行われているが、未だ実用に達していない。

本研究では、インスリンを封入したマイクロカプセルを精密に分子設計することにより、ブドウ糖濃度に応じてインスリンを放出することのできるミクロな分子装置（マイクロカプセル）を開発を試みた。従来の「人工膵臓」はインスリン貯蔵タンクとセンサーを組み合わせた電気機械装置であるのに対して、本研究で開発するのは化学反応を利用したミクロな分子装置であることが特徴である。このため、装置のサイズや性能の制御など、従来の方法とは全く異なる観点から研究することができた。

3. 研究の方法

本研究の具体的な目標は、Fig.1に示すような生理的条件下でブドウ糖濃度が上昇したときにインスリンを放出するマイクロカプセルを作製することである。

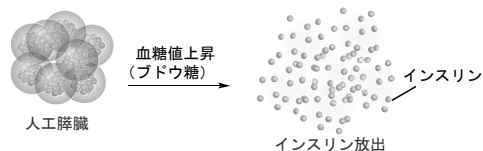


Fig.1 インスリン放出マイクロカプセル

このため、LBL法によりカプセルを調製した(Fig.2)。①まずインスリンを含有したCaCO₃のマイクロ粒子（直径1～10ミクロン）を調製する。②次にこのCaCO₃マイクロ粒子の表面を互いに親和性を持つ2種類の異なる

ポリマーで交互に被覆する。③最後にCaCO₃粒子をEDTAにより溶解除去して、目的とするインスリン封入マイクロカプセルを得た(Fig.2)。

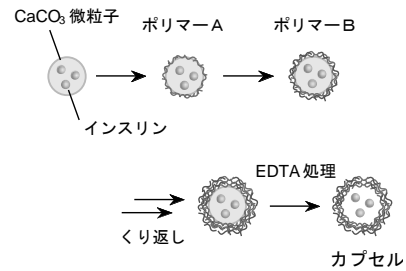


Fig.2 LBLマイクロカプセルの調製方法

本研究のポイントは、マイクロ粒子の表面を被覆するためにブドウ糖応答性ポリマー材料を用いることである。具体的には、フェニルボロン酸修飾ポリマーおよびジオール構造を持つ高分子を用いた。フェニルボロン酸はFig.3のようにジオール構造と結合する性質を有するので、上記2種のポリマーは化学結合してカプセル皮膜を形成しインスリンを封入することができる。

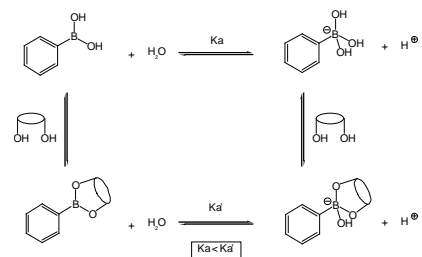


Fig.3 フェニルボロン酸とジオールの結合

一方、ブドウ糖が存在するとブドウ糖がフェニルボロン酸に競合的に結合するので、カプセル皮膜が破壊されて、インスリンが放出される(Fig.4)。よって、生理的条件下(pH 7.4)でブドウ糖に反応するカプセルを設計するために、ポリマーに修飾するフェニルボロン酸誘導体やジオール高分子の種類を検討した。

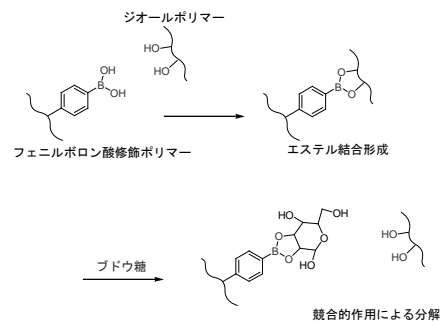


Fig.4 カプセル膜の分解機構

4. 研究成果

1) 糖応答薄膜の検討

フェニルボロン酸修飾ポリマーと種々のジオール構造を持つ高分子材料を用いてナノ薄膜を網羅的に調査し、調製条件を最適化するとともに、各薄膜の膜厚、安定性、などの基本的な膜物性を調査した。膜厚は水晶振動子マイクロバランスにより評価した。フェニルボロン酸誘導体は、それぞれジオール化合物との親和性と至適 pH が異なるため以下のようなボロン酸誘導体修飾高分子 (Fig. 5) およびジオール構造を含む高分子 (AGA、ポリビニルアルコール、グリコゲンなどの糖鎖類など) を検討した。

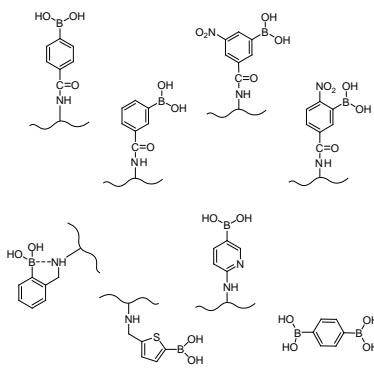


Fig.5 薄膜調製のために検討したボロン酸修飾高分子の構造

その結果、フェニルボロン酸を修飾したポリアリルアミン (PBA-PAH) と天然糖鎖であるアルギン酸 (AGA) の組み合わせが検討した中でもっとも良い応答性を示した。このため、以下のマイクロカプセルは主にこの条件で調製した。

2) インスリン含有する CaCO_3 の調製

マイクロカプセルを調製する際にテンプレートとして用いるインスリン封入 CaCO_3 粒子は次のようにして調製した。すなわち、111 mg の塩化カルシウムと 10 mg のインスリンを 5 mL の純水に溶解し、この溶液を別途調製した 96 mg の炭酸アンモニウムと 20 mg の PSS を溶解した 5 mL の水溶液に添加して、室温にて 30 分間攪拌した。生成した CaCO_3 粒子を遠心分離し純水で洗浄し、インスリンを内部に含有する CaCO_3 粒子を得ることができた。

インスリン封入 CaCO_3 粒子の光学顕微鏡写真および蛍光顕微鏡画像を Fig.6 に示す。インスリンは FITC で蛍光標識したのを用い、粒子内部からこの蛍光が観察できることから CaCO_3 粒子内部にインスリンが取り込まれていることを確認した。また、 CaCO_3 粒

子を希塩酸 (pH 3.0) に溶解させてインスリンに起因する蛍光強度を測定したところ、1 g の CaCO_3 粒子に約 86 mg のインスリンが含まれていることがわかった。

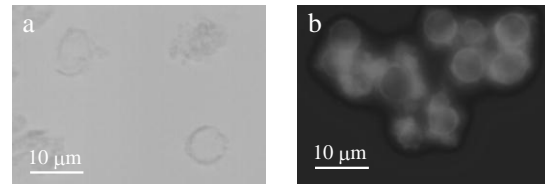


Fig. 6 CaCO_3 粒子の光学顕微鏡および蛍光顕微鏡画像

3) LBL ミクロカプセルの調製

LbL ミクロカプセルは次のようにして調製した。 CaCO_3 粒子を 1 mg mL^{-1} PBA-PAH 溶液 (0.1 M HEPES 緩衝液、pH 7.0) に 15 分間分散して、 CaCO_3 粒子表面に PBA-PAH 層を吸着させた。用いた緩衝液で 1 分間洗浄した後に遠心分離して集めた CaCO_3 粒子を、 1 mg mL^{-1} AGA 溶液 (0.1 M HEPES 緩衝液、pH 7.0) に 15 分間分散して、PBA-PAH 吸着 CaCO_3 粒子の表面に AGA 層を吸着させた。これらの操作を繰り返すことにより、インスリン封入 CaCO_3 粒子の表面を 5 層の PBA-PAH/AGA 交互累積膜により被覆した。この交互累積膜被覆 CaCO_3 粒子を 100 mM EDTA 溶液に室温で 5 分間浸して CaCO_3 を溶解除去し、100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) にて 2 回洗浄して、インスリン封入マイクロカプセルを得ることができた。

Fig.7 に、調製したマイクロカプセルの蛍光顕微鏡画像を示す。あらかじめ PBA-PAH を TRITC によって蛍光標識したのを用いた。インスリン由来の FITC およびカプセル膜由来の TRITC の蛍光が確認でき、これより PBA-PAH と AGA の両高分子によって直径 5-10 μm 程度のインスリンを含有したマイクロカプセルが調製できることを確認した。

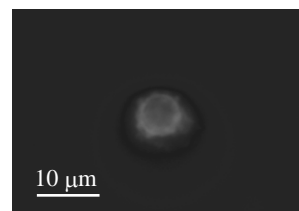


Fig.7 LBL ミクロカプセルの蛍光顕微鏡画像

これらのマイクロカプセルは pH 7.0 の PBA-PAH および AGA 溶液を用いて調製したので、PBA-PAH は正に、AGA は負に帯電しており、これら両者のフェニルボロン酸とジオールの結合の他にも静電的結合によりマイクロカプセルの (PBA-PAH/AGA)₅ 膜が形成されたものと考えられる。また、調製したミク

ロカプセルは pH 7.0–9.0 の緩衝液に分散して、マグネチックスターラーにより穏やかに攪拌しても形状や大きさの変化、またはカプセルの破壊などは認められなかったことから、以後のインスリン放出実験に用いるのに十分な力学的強度を有していることを確認した。

4) LBL ミクロカプセルの糖応答性

次に、ミクロカプセルからのインスリンの放出挙動を検討した。Fig.8 に、インスリン封入ミクロカプセルを pH 9.0 の緩衝液に分散し、15 分毎に遠心分離によりミクロカプセルを測定セルの底に沈めた上清の蛍光スペクトルを示す。測定開始から 60 分後までは試料溶液に糖を共存させなかったが、インスリンの放出がわずかに認められた。一方、60 分後に試料溶液にフルクトースを 100 mM 添加すると、インスリンの放出量の著しい増大が観察された。フルクトースはフェニルボロン酸類と強く結合することが知られておりカプセル糖応答性能を評価するために用いた。添加されたフルクトースがミクロカプセル膜中に存在する PBA-PAH に結合したことに伴い、インスリンの放出が促進されたものと考えられる。

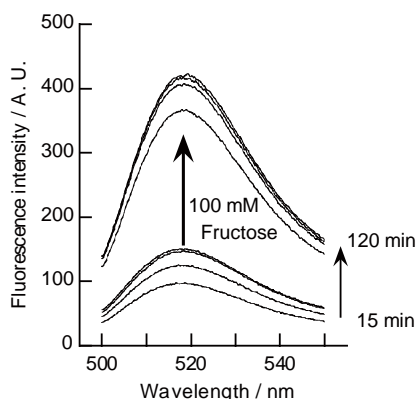


Fig.8 ミクロカプセルからのインスリン放出

ミクロカプセルからのインスリンの放出が増大した原因として、ミクロカプセルが分解したか、あるいは(PBA-PAH/AGA)₅ 膜の構造変化により透過性が増大したか、二つの可能性が考えられる。実際に、フルクトース添加後のミクロカプセルを光学顕微鏡で観察したところ、フルクトース添加前には観察された球形のミクロカプセルが観察できなかった。これより、ミクロカプセルが分解してインスリンが放出されたものと思われる。

Fig.9 に、フェニルボロン酸残基の導入率が異なる二種類の PBA-PAH (4.5%および12%) を用いて調製したミクロカプセルからの pH 9.0 におけるインスリンの放出挙動を示す。どちらのミクロカプセルでも最初の 15 分以

内に 15-20%のインスリンが放出されたが、その後 1 時間以内の放出が抑制されていることから考えると、15 分以内に放出されたインスリンはミクロカプセルの内部ではなく (PBA-PAH/AGA)₅ 膜に吸着していたものと推定される。両ミクロカプセルのフルクトースに対する応答性を比較すると、フェニルボロン酸導入率 12%の PBA-PAH を用いて調製されたミクロカプセルの方が明らかに高い応答性を示した。この結果は、フルクトースと (PBA-PAH/AGA)₅ 膜中のフェニルボロン酸残基との結合が引き金となってインスリンの放出が増大していることを強く支持するものである。

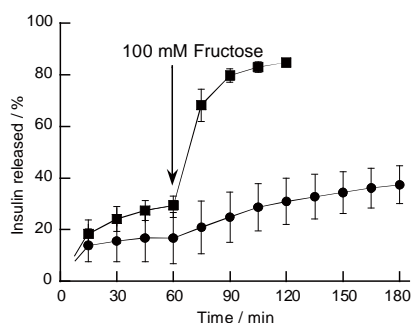


Fig.9 PBA 修飾率の影響、12% (■)、4.5% (●)

ミクロカプセルからのインスリン放出挙動に対する pH の影響についても検討した。pH 9.0 で実施した上述の結果とは対照的に、pH 7.0 の緩衝液中では 100 mM のフルクトースを添加してもインスリンの放出はほとんど促進されなかった。一方、pH 8.0 においてはフルクトース添加 30 分後に約 15%の放出がみられたが、pH 9.0 における結果と比較するとインスリン放出の促進効果は低かった。一般に、フェニルボロン酸とジオール類との結合定数は酸性および中性条件に比較して弱塩基性条件で高いことが報告されており妥当な結果である。ミクロカプセルの応答性の pH 依存性からも、フルクトースとカプセル膜中のフェニルボロン酸残基との結合がインスリン放出の引き金となっていることが支持される。

(PBA-PAH/AGA)₅ 膜にフルクトースが結合してミクロカプセルが分解する機構は以下のように推定することができる。(PBA-PAH/AGA)₅ 膜中では PBA-PAH と AGA が静電的に結合すると同時に、一部のフェニルボロン酸残基と AGA 中のジオール部位はエステル結合を形成していると考えられる。添加されたフルクトースは競合的にフェニルボロン酸残基に結合し、その結果 PBA-PAH と AGA との結合が切断されミクロカプセルが不安定化する。さらに、フェニルボロン酸エステルは負電荷を有するために、

(PBA-PAH/AGA)₅ 膜中で AGA 中の解離したカルボキシル基との静電的反発によりマイクロカプセルが不安定化して分解に至ったものと思われる。いずれにしても、(PBA-PAH/AGA)₅ 膜へのフルクトースの結合に伴い、上記二種類の機構が共同的に作用してマイクロカプセルが分解したものと考えられる。

糖の結合に伴いマイクロカプセルが分解する際の想定される機構を Fig.10 に示した。これまでに報告されているフェニルボロン酸修飾交互累積膜やマイクロカプセルの糖に対する応答では、どちらかの機構が単独で作用すると報告されているが、本研究では AGA を用いたので両機構が同時に作用しているものと推定される。

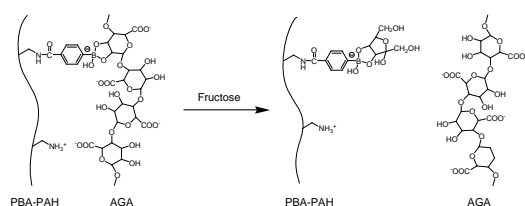


Fig.10 カプセル分解機構

糖類の中でフルクトースが最も強くフェニルボロン酸に結合することが知られているため、これまでフルクトースを用いてマイクロカプセルの糖応答性を検討した。一方、インスリンは糖尿病患者の血糖値を低下させるための薬物であり、血液中のグルコース濃度が正常値より上昇した際に投与される。したがって、本研究で調製したマイクロカプセルはグルコース添加時にインスリンの放出が促進されることが望まれる。そこで、インスリン封入マイクロカプセルの分散液に濃度の異なるフルクトースおよびグルコースを添加した際のインスリンの放出挙動について比較検討した (Fig.11)。フルクトースを添加したときには、添加した濃度に応じてインスリンの著しい放出促進が観察された。一方、グルコースを添加したときにもインスリンの放出がある程度促進された。血糖の正常値は約 5 mM 程度であることを考慮すると、10 mM グルコースを添加したときにもインスリンの放出が促進されたことは、このマイクロカプセルの有用性を示唆している。

しかし、生理的条件に近い pH 7.0-8.0 の緩衝液中で同様の実験を行ったところ、10 mM グルコースに対するマイクロカプセルの応答は非常に低く満足すべき結果は得られなかった。これは、フェニルボロン酸のグルコースに対する結合定数は 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 4.6 M^{-1} と報告されており、同条件でのフルクトースに対する結合定数

($1.6 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$) と比較して非常に小さいことに起因している。今後、生理的条件でのグルコースに対する応答性を向上させるための改善が必要であり、PBA-PAH の化学構造の改良やマイクロカプセル調製条件の再検討などを実施する予定である。

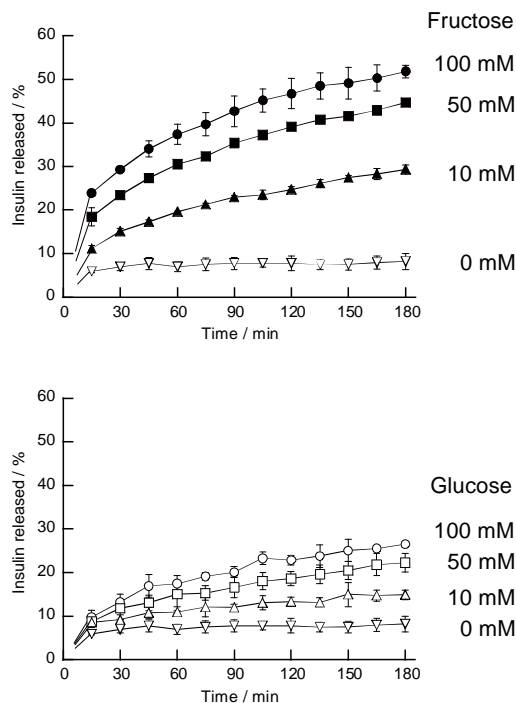


Fig.11 LBL カプセルのフルクトースおよびグルコース応答

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 3 件)

1. インスリンを含有する高分子マイクロカプセルの調製および糖応答性, 佐藤勝彦, 児玉大祐, 遠藤好弘, 吉田健太郎, 安斉順一, 高分子論文集, 67, 544-548 (2010). (査読有)
2. Sugar-dependent solubility and fluorescence property of copolymers consisting of phenylboronic acid and 2-hydroxyethyl methacrylate moieties, Katsuhiko Sato, Tatsuya Nakajima, Yu Yasukawa, Jun-ichi Anzai, Polymer Bulletin, 65, 807-814 (2010). (査読有)
3. Layer-by-layer polyelectrolyte films containing insulin for pH-triggered release, Kentaro Yoshida, Katsuhiko Sato, Jun-ichi Anzai, Journal of Materials Chemistry, 20, 1546-1552 (2010). (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. CaCO₃ 粒子表面での重合反応によるカプセルの調製, 佐藤勝彦, 中島達也, 安斉順一, 第 49 回日本薬学会東北支部大会, 2010 年 10 月 24 日, 郡山
2. グルコースセンサ機能をもつインスリンカプセル, 佐藤勝彦, 児玉大祐, 安斉順一, 第 48 回化学センサ研究発表会, 2009 年 9 月 10 日, 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: