

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410141

研究課題名(和文) 高分子ゲルの膨潤をシグナル増幅の原理とする糖センシングナノ粒子の開発

研究課題名(英文) Development of Sugar Sensing Nanoparticles with Signal Amplification Based on Swelling of hydrogel

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： 血糖値を連続的にモニターできる皮下埋め込み型デバイスの開発を目的とし、グルコースレセプター/レセプター感受性色素複合体を架橋点とするセミ相互侵入構造を持つオプティカルセンシングフィルムを構築した。このセンシングフィルムは、グルコースの濃度に応じてレセプターが競争的にグルコースと錯形成するのに伴い色素が解離しフィルムが色変化するが、架橋点の減少に伴うフィルムの膨潤により更なる架橋点の解離が促進され、グルコースに対する色変化応答が増幅される。構築したセンシングフィルムはグルコース濃度に応じて可逆的に膨潤・収縮し、生理的グルコース濃度範囲で約20%という大きな吸光度応答を示した。

研究成果の概要(英文)： In order to develop subdermally implantable devices for continuous blood glucose monitoring, we fabricated optical glucose sensing films with the semi-interpenetrating polymer network (semi-IPN) structure composed of glucose receptor-attached polymers and receptor specific dye-attached polymers, in which the receptor/dye complexes act as crosslinking points. The glucose sensing principle is based on the competitive binding of the receptor between the dye and glucose, providing a swelling of the sensing film due to the decrease in the number of crosslinking points in the polymer network: the swelling facilitates further dissociation of the receptor/dye complexes, leading to amplification of sensor color responses. The thus prepared sensing films showed remarkable absorbance responses for glucose (around 20% absorbance change in physiological glucose level) with reversible polymer swelling and shrinking.

研究分野：分析化学

キーワード：オプティカルセンサー 血糖値 グルコースレセプター ビスベンゾボロキソール 高分子架橋点 ポリマー膨潤

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病患者の厳密な血糖値管理のため、血糖値を連続的に精度良く測定でき、かつ患者の負担の少ないシステムの開発が切望されている。これまで種々の低侵襲血糖値センシングシステムが報告・開発されてきたが、その多くはグルコース酸化酵素(GOX)を用いた電気化学検出に基づくもので、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、装着時の患者の負担が大きい。これに対し、センサー自身を皮下に完全に埋め込み、皮膚を介してセンサーの光学的特性変化をモニターするかたちの、より患者の負担が少ないシステムが考案されている。例えば、McShane らは、GOX と蛍光色素を含浸させたセンシングビーズを開発している<sup>1)</sup>。彼らは皮膚を切開しこの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をモニターする“スマート刺青”の開発を目指している。また我々は、GOX に基づく皮下埋め込み用色変化応答型糖センシングマイクロカプセルの開発研究を行っている<sup>2)</sup>。これはGOX 及び pH 応答色素固定化ビーズを透過性制御膜で覆ったマイクロカプセル状センサーで、グルコースに対し可逆的かつ明瞭に色変化を示すものである。しかしこれらのセンサーは、感応素子として酵素を使用しているため、基質特異性という利点はあるものの化学的安定性に欠け、センサーを皮下に長期滞在させるには難がある。

(2) 近年糖を認識する合成レセプターの研究が盛んに行なわれ、糖と可逆的にエステル錯体を形成するボロン酸レセプターに基づくセンサーが種々報告されている。Takeuchi らは蛍光性糖レセプターを高分子ゲルに固定化したかたちのグルコースセンサーを開発し、センサーを長期間マウスの耳に埋め込むことが可能で血糖値に応じた蛍光強度変化が得られることを示している<sup>3)</sup>。このセンサーは蛍光団アントラセンにボロン酸を導入したレセプターに基づくもので、糖認識に伴う蛍光団のPET 解消を応答原理としているが、励起・蛍光波長が可視領域にあり皮膚組織の光学的干渉を受ける。また、糖認識部位と蛍光団がレセプター分子内に組み込まれているので、レセプターの励起蛍光波長を変化させるためにはレセプター全体の再設計が必要となる。これに対し、我々は競争的錯形成反応に基づく合成レセプター/機能性色素固定化センサーの開発を行ってきた。これは糖を認識するフェニルボロン酸レセプター及びレセプターとの錯形成により色変化する機能性色素を設計・合成し、これらを高分子ゲルに固定化したもので、レセプターと色素は独立しており自由に組み合わせることができる。試料溶液中に糖が存在すると、固定化レセプターと固定化色素/糖間の競争的錯形成反応により、高分子ゲル中の固定化レセプター/色素錯体が糖濃度に応じて解離し、センサーの色が変わる。しかし、このセンサ

ーの糖に対する色変化応答は、固定化していないレセプター/色素溶液の糖に対する色変化応答に比べてきわめて小さい。これは、レセプターと色素が近接して高分子ゲルに固定化されるため、生成した錯体が安定化され、糖に対する競争的錯形成に伴う固定化色素の解離が進行しないためだと考えられる。従って、このセンサーの色変化応答を増大させるためには、固定化レセプターの糖認識に伴ってレセプター/固定化色素の解離を促進する何らかの機序を組み込む必要がある。

(3) 一方、フェニルボロン酸を固定化した高分子ゲルは、糖濃度に応じ可逆的に膨潤収縮することが知られている。これは固定化フェニルボロン酸が糖と錯形成をすると陰電荷を帯び、ゲルの浸透圧が変化するためである。このような分子刺激応答性ゲルの開発研究は、主にドラッグデリバリーシステムへの応用を目指して近年盛んに行なわれている。例えば、Miyata らは抗原、DNA 等に対して膨潤収縮する分子インプリントゲルや生体分子架橋ゲルを報告している<sup>4)</sup>。そこで我々は、この分子刺激による高分子ゲルの膨潤収縮による体積変化の機構を、競争的錯形成に基づく色変化応答センシングのシグナル増幅に利用することを考えついた。

2. 研究の目的

本研究は、低侵襲的に血糖値をモニターできる皮下埋め込み型ウェアラブルセンサーの構築を目指した、高分子ゲルの膨潤に基づくシグナル増幅能を有し、糖濃度に応じて迅速かつ明瞭に色が変わる、レセプター/機能性色素複合体を架橋点とした糖センシング高分子ゲルナノ粒子の開発を目的とする。これは、ボロン酸糖レセプター及びレセプター感応性色素に重合性官能基を導入し、これらを単官能モノマーと分散/乳化共重合させることによって調製するもので(図1 a)、試料中の糖と高分子ゲル架橋点の固定化レセプターとの競争的錯形成に伴って固定化色素が錯解離し、高分子ゲルの色変化をもたらす(図1 b)。また、この競争的錯形成により高分子ゲルの架橋点が減少しゲルが膨潤すると、固定化レセプター/色素間の距離が増大し、更なる架橋点の解離が促進され、糖に対する色変化応答が増幅されるものである(図1 c)。

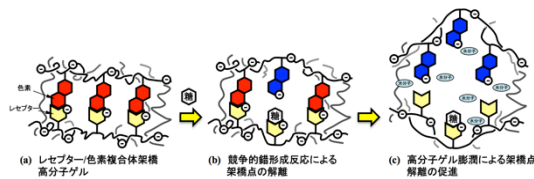


図1 高分子ゲル膨潤による糖応答シグナル増幅機構の概念図

3. 研究の方法

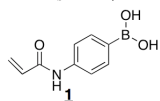
(1) 糖センシングゲル用レセプターとレセプター感受性色素の合成

重合性官能基を有するレセプター及びレ

レセプター感受性色素の合成方法を以下に記す。

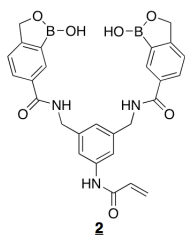
①重合性官能基を有するフェニルボロン酸レセプターの合成

4-ニトロフェニルボロン酸のニトロ基をPd/C-ギ酸アンモニウムで還元した後塩化アクリロイルで処理し、重合性官能基を有するフェニルボロン酸 **1** を得た。(2 steps 収率 40%)



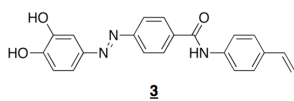
②重合性官能基を有するビスベンゾポロキソール型グルコースレセプターの合成

2-ブロモ-4-カルボキシトルエンをリチオ化後トリメトキシボランでホウ素化し、メチルエステル化保護、アセタール保護し、活性メチル基をNBS/AIBNで臭素化後加水分解することにより5-カルボキシベンゾポロキソールを得た。別途1,3-ジメチル-5-ニトロベンゼンをNBS/ベンゾイルペルオキサイドで処理し、活性メチルを臭素化した後アジ化ナトリウム/トリフェニルホスフィンで処理し、1,3-ビスアミノメチル-5-ニトロベンゼンを得た。これと5-カルボキシベンゾポロキソール2分子をDMT-MMを用いて脱水縮合した後、ニトロ基をPd/C/H<sub>2</sub>で還元し、アクリル酸と脱水縮合させることによって、重合性官能基を有するビスベンゾポロキソール型グルコースレセプター **2** を合成した。(10 steps 合成収率 18%)



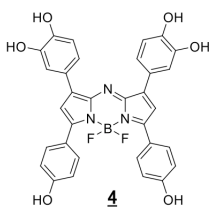
③重合性官能基を有するレセプター感受性アゾ色素の合成

硫酸アルミニウム存在下、カテコールと *p*-アミノ安息香酸をジアゾカップリングし、ジヒドロキシアゾベンゼンカルボン酸を得た。これと *p*-アミノスチレンをDMT-MMを用いて脱水縮合し、重合性官能基を有するレセプター感受性アゾ色素 **3** を合成した。(2 steps 合成収率 32%)



④レセプター感受性近赤外吸収アザボロンジピロメセン(azaBODIPY)色素の合成

4-ヒドロキシアセトフェノンと3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドをアルドール縮合した後水酸基をMOM保護し、ニトロメタンを用いてカルボニルのβ位をニトロメチル化した。ブタノール溶媒中還流することで2分子縮合させた後、脱保護しトリフルオロホウ素エーテル錯体で処理し、azaBODIPY色素 **4** を得た。(6 steps 収率 20%)



(2) 糖センシングゲルの構築

レセプター/色素複合体を架橋点とするセンシングフィルムは、レセプター・色素・単官能モノマーを共重合させたものと(ランダム構造)レセプター共重合ポリマーと色素共重合ポリマーが絡み合ったセミ相互侵入構造のもの(semi-IPN構造)の2通りの構築法で調製した。以下に代表的なセンシングフィルム構築法を示す。

①ランダム構造を持つセンシングフィルムの構築

単官能モノマー(アクリルアミド(AA), メタクリル酸(MA), ジメチルアクリルアミド(DMAA), N-イソプロピルアクリルアミド(NIPAM)あるいは2-ヒドロキシエチルメタクリレート(DMAA))300mg, イオン交換水180mg, 色素4.0mg, レセプター4.0mg, 熱重合開始剤0.6mgをDMSO 0.5mLに溶解し、これを0.1mm厚のスぺーサーを挟んだ2枚の表面疎水化スライドガラスで構成された鋳型に流し込み、熱重合させることによりランダム構造を持つセンシングフィルムを構築した。

②semi-IPN構造を有するセンシングフィルムの構築

単官能モノマーとレセプター及び光重合開始剤を含むDMSO溶液を上記の鋳型に流し込み、光重合することによりレセプター共重合フィルムを調製した。ここに色素及び熱重合開始剤を含む単官能モノマー溶液を一昼夜含浸させ、余分なモノマー溶液を拭き取った後熱重合させることによりsemi-IPN構造を持つセンシングフィルムを構築した(図2)。

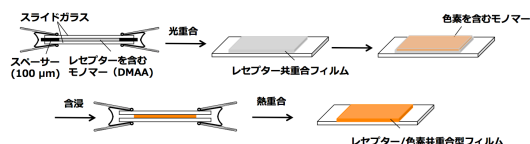


図2 semi-IPN構造を持つレセプター/色素共重合型センシングフィルムの構築法

(3) センシングフィルムの糖に対する応答評価

作製したセンシングフィルムを自作のフローセルに組み込み、各濃度の糖を含むpH7.40のリン酸緩衝液(PBS)を送液しながら吸光度計あるいは光ファイバー分光器を用いて吸収スペクトルを測定した。また、センシングフィルムの糖添加による膨潤の過程は、ビデオ顕微鏡を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) フェニルボロン酸レセプター **1** とアゾベンゼン色素 **3** に基づくセンシングフィルムのフルクトースに対する応答評価

まず、レセプター/色素複合体を架橋点とするセンシングフィルムの糖に対する応答特性を評価するために、合成が容易なフェニルボロン酸をレセプターとして用いた。また、

フェニルボロン酸はグルコースに対する認識能が乏しいので、フルクトースに対する応答を評価した。

①センシングフィルム構築の際の単官能モノマーの種類の評価

電荷を持たない単官能モノマーである AA, DMAA, NIPAM 及び HEMA に基づくセンシングフィルムを構築し、フルクトースに対する応答を評価した。その結果、AA に基づくものはフルクトース添加に伴いフィルムの溶出が見られ、HEMA に基づくものは糖濃度に応じたフィルムの膨潤がほとんど見られなかった。また電荷を帯びたメタクリル酸を用いた場合もフィルムの溶出が観測された。そこで以降のフィルムの構築では、糖に対する可逆的な膨潤・収縮を示すフィルムが構築できる NIPAM あるいは DMAA を用いることとした。

②ランダム構造及び semi-IPN 構造を有するセンシングフィルムのフルクトースに対する応答評価

図 3a にランダム構造を有するセンシングフィルム、図 3b に semi-IPN 構造を有するセンシングフィルムのフルクトースに対する吸収スペクトル応答を示す。

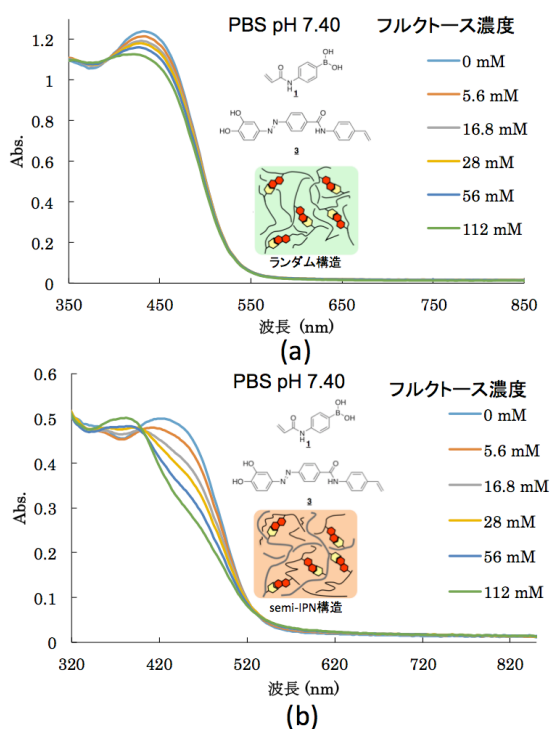


図3 フェニルボロン酸レセプター1/アゾベンゼン色素3/NIPAM共重合センシングフィルムのフルクトースに対する吸収スペクトル応答 a)ランダム構造のフィルム b)semi-IPN構造のフィルム

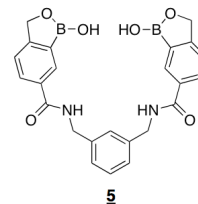
いずれのセンシングフィルムもフルクトース濃度が増加するに従って 430 nm 付近の吸光度が減少しており、競争的にレセプターが糖と錯形成することによりレセプター/色素複合体が解離していることを示している。また、semi-IPN 構造のフィルムの方がランダム構造のものより遥かに大きなスペクトル応答を示すことが分かった。これは semi-IPN 構造の高い流動性に起因するものと考えら

れる。semi-IPN 構造のフィルムは 56 mM フルクトース溶液中で 165%の膨潤を示しており、これにより高分子ポリマーの膨潤によりオプティカル糖センサーの応答が増大するという我々が初めて提唱したセンサー応答増幅機構が検証できた。

(2) 新規ビスベンゾボロキソール型グルコースレセプターの開発

フェニルボロン酸 (PBA) はジオール化合物とエステル錯体を形成するが、グルコースに対する錯形成定数は  $3 \text{ M}^{-1}$  と極めて小さい。これは PBA が水溶液中で極僅かにしか存在しないグルコフラノースとのみ錯形成しているためであることが知られている。一方、ヒドロキシメチルフェニルボロン酸の脱水閉環体であるベンゾボロキソール (BB) はそのヘテロ 5 員環の歪みにより溶液中で支配的なグルコピラノースの 4-, 6-ジオールと錯形成可能で、グルコースに対する錯形成定数が  $100 \text{ M}^{-1}$  と PBA によるものに比べ増大することが報告されている。そこで我々は高いグルコース認識能を有するレセプターの開発を目的とし、2 ユニットの BB をリンカーで繋いだかたちの、グルコースを多点で認識する一連のレセプター (bis-BB レセプター) を設計・合成し、そのグルコースに対する錯形成能の評価を行った。

合成した 16 種類の bis-BB レセプターのうち、*m*-ジアミノキシレンをスペーサーとして用いた bis-BB レセプター **5** がグルコースに対し最も高い錯形成定数 ( $2000 \text{ M}^{-1}$ ) を有することを見出した。我々が開発したレセプター **5** のグルコースに対する錯形成能は、これまで報告されている最も優れたグルコースレセプターの錯形成能に匹敵するものである。



(3) ビスベンゾボロキソール (bis-BB) レセプター **2** とアゾベンゼン色素 **3** に基づくセンシングフィルムのグルコースに対する応答評価

我々が開発したグルコースに対する認識能が最も高いレセプター **5** に重合性官能基を導入したレセプター **2** と色素 **3** 複合体を架橋点とし、単官能モノマーとして DMAA を用いた semi-IPN 構造の共重合型センシングフィルムのグルコースに対する吸収スペクトル応答を図 4 (a) に示す。グルコース濃度の増加に伴い、432 nm 付近のピークが消失すると共にフィルムの膨潤に伴って吸光度が全波長領域で減少していることが分かる。一方、レセプター **5** にカルボキシル基を導入したレセプター **6** とカルボキシアリザリン **7** を AA ハイドロゲルのアミノ残基にアミド結合を介して固定化したフィルムのグルコー

スに対する吸収スペクトル応答は共重合型フィルムへの応答に比べてはるかに小さいものであった(図4(b))。

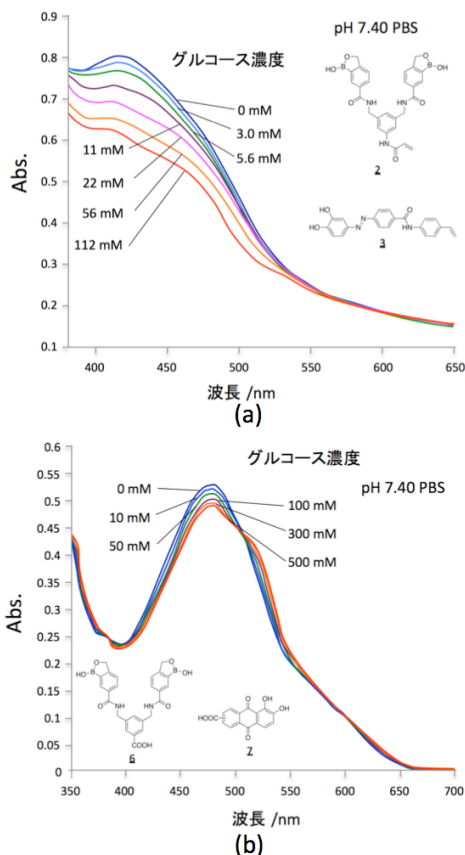


図4 (a)semi-IPN構造を有するbis-BBレセプター2/アゾベンゼン色素3/DMAA共重合センシングフィルム(b)bis-BBレセプター2/アリザリン色素7をアミド結合を介してAAハイドロゲルに固定化したフィルムのグルコースに対する吸収スペクトル応答

図5にレセプター2と色素3に基づくsemi-IPN構造共重合型センシングフィルムのグルコースに対する吸光度応答の経時変化を示す。グルコース濃度に応じた高分子ポリマーの膨潤・収縮により、2分程度の応答時間で可逆的な吸光度応答を示した。この応答の可逆性は、センシングフィルム構築時の重合性レセプターとレセプター感受性色素の添加量及び微量の架橋剤の存在に大きく依存しており、引き続き詳細に検討中である。なお、研究当初は高分子膨潤・収縮速度が遅いと予想し、センサー応答時間の改善のためセンシングゲルのナノ粒子化を予定していたが、センシングフィルムの応答速度が当初目的のセンサー応答時間の条件を満たしたため、ゲルのナノ粒子化は行わなかった。

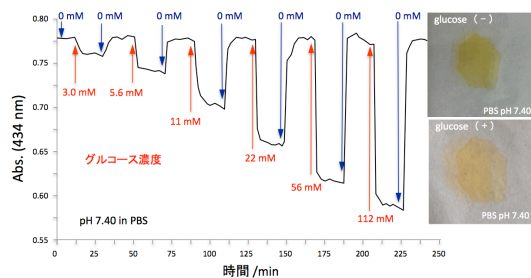


図5 semi-IPN構造を有するbis-BBレセプター2/アゾベンゼン色素3/DMAA共重合センシングフィルムのグルコースに対する吸光度応答の経時変化

図6にフェニルボロン酸レセプター1とbis-BBレセプター2に基づく共重合型センシングフィルムのグルコース濃度に対する吸光度変化率を示す。フェニルボロン酸に基づくフィルムは、レセプターの乏しいグルコース認識能を反映して、ほとんどグルコースに対する吸光度応答を示さないが、bis-BBレセプターに基づくものは、大きな吸光度応答を示すことがわかる。このレセプター2に基づくセンシングフィルムは生理的グルコース濃度範囲で約20%の吸光度変化率を示しており、これまで報告されている合成レセプターに基づくオプティカルグルコースセンサーの中で最も応答のダイナミックレンジが大きいセンサーである。

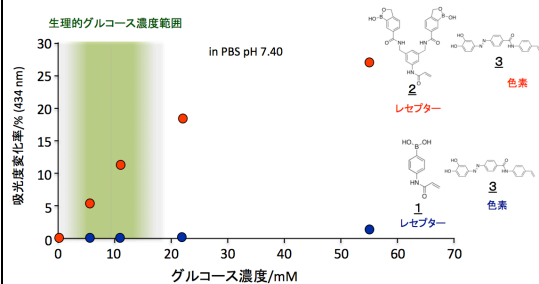


図6 semi-IPN構造を有するフェニルボロン酸レセプター1/色素3/DMAA共重合センシングフィルム(●)とbis-BBレセプター2/色素3/DMAA共重合センシングフィルム(●)のグルコースに対する吸光度応答率

#### (4) レセプター感受性近赤外吸収azaBODIPY色素の開発

ここまでレセプター感受性色素として、アゾベンゼン色素を用いてきたが、この色素の最大吸収波長は可視光領域であり、皮膚組織の光学的妨害のためセンサーを皮下埋め込み型にするためには難がある。そこで、皮膚組織の光学的妨害の少ない近赤外波長領域に最大吸収波長を持つレセプター感受性色素の設計・合成を行った。種々の近赤外波長領域に最大吸収波長を有する拡張π共役ボロンジピロメセン(BODIPY)色素にレセプター認識部位であるカテコールを導入し、フェニルボロン酸添加による吸収スペクトルの変化挙動を検討した結果、azaBODIPY色素4が近赤外波長領域での最大の吸収スペクトル変化を示した(図7)。現在、色素4に重合性官能基を導入し、これとbis-BBレセプター2に基づく共重合型センシングフィルムのグルコースに対する応答特性の評価を引き続き行っている。

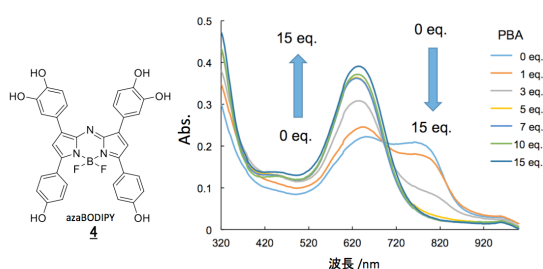


図7 レセプター感受性azaBODIPY近赤外吸収色素4溶液のフェニルボロン酸添加による吸収スペクトル変化

<引用文献>

- 1) E. W. Mcshane, et al., *Anal. Chem.* 2008, 80 1408, 2) Tohda, et al., *Chemphyschem.* 2003, 4, 101, K. Tohda, et al., *Anal. Sci.* 2006, 22, 937, K. Tohda, et al., *Anal. Sci.* 2006, 22, 383, K. Tohda, et al., *Supramol. Chem.* 2010, 22, 425-433, 3) S. Takeuchi, et al., *PNAS* 2010, 107, 17894, *PNAS* 2011, 108, 13399, 4) T. Miyata, et al., *Polym. J.* 2008, 42, 227

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 2件)

- ① K. Tohda, Basic knowledge of mathematical theories of analytical chemistry-mathematical expressions in electroanalytical chemistry, *Bunseki*, 8, 2014, 398-405 (査読なし). <http://www.jsac.or.jp/bunseki/201408.html>
- ② K. Tohda, Development of optical sugar sensors as implantable devices for interstitial glucose monitoring, *Bunseki Kagaku*, 62, 2013, 903-914 (査読あり). [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bunsekikagaku/62/10/62\\_903/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bunsekikagaku/62/10/62_903/_pdf)

[学会発表] (計 11件)

- ① 遠田浩司, ビスベンゾボロキソール型レセプターに基づくオプティカル糖センシングフィルムの開発, 第76回分析化学討論会, 2016, 5/28, 岐阜薬科大, 岐阜(依頼講演).
- ② K. Tohda, Bisbenzoboroxole receptors: Design, synthesis and their application in optical glucose sensors”, The eighth international forum on chemistry of functional organic chemicals (IFOC-8), Univ. of Tokyo, Tokyo, Nov. 15, 2015 (主催 日本学術振興会 116 委員会), (招待講演).
- ③ 山川翔平, 吉川慧, 菅野憲, 遠田浩司, 重合性官能基を有するベンゾボロキソールレセプターに基づくグルコースセンシングフィルムの構築, 日本分析化学会第64年会, 2015, 9/9, 九州大学, 福岡.
- ④ 久保木博子, 菅野憲, 遠田浩司, インドール型 BODIPY 色素の合成とオプティカルセンサーへの応用, 日本分析化学会第64年会, 2015, 9/9, 九州大学, 福岡.
- ⑤ 河崎屋光司, 菅野憲, 遠田浩司, 表面修飾ガラス基板を用いたオプティカルグルコースセンサーの構築, 日本分析化学会第64年会, 2015, 9/9, 九州大学, 福岡.
- ⑥ 川上創平, 詠智寛, 菅野憲, 遠田浩司, オプティカルセンサー用 BODIPY 色素の開発: 分子構造と吸収スペクトル及び pKa の相関, 日本分析化学会第64年会,

2015, 9/9, 九州大学, 福岡.

- ⑦ 山岸星諭, 河崎屋光司, 菅野憲, 遠田浩司, 色変化応答型グルコースセンサー用アルキニル BODIPY 色素の合成と固定化法の検討, 日本分析化学会第64年会, 2015, 9/10, 九州大学, 福岡.
- ⑧ 日下部智陽, 出先雄太, 菅野憲, 遠田浩司, 高分子ゲルの膨潤をシグナル増幅の原理とするオプティカル糖センシングフィルムの開発, 日本分析化学会第64年会, 2015, 9/10, 九州大学, 福岡.
- ⑨ 詠智寛, 菅野憲, 遠田浩司, ボロン酸レセプター/BODIPY 系色素の基づくオプティカル糖センシングフィルムの開発, 日本分析化学会第63年会, 2014, 9/17, 広島大学, 広島.
- ⑩ 出崎雄太, 菅野憲, 遠田浩司, ボロン酸レセプター/機能性色素複合体を架橋点とする糖センシング高分子ゲルフィルムの合成と評価, 日本分析化学会第63年会, 2014, 9/17, 広島大学, 広島.
- ⑪ 吉川慧, 末廣智子, 遠田浩司, ビスベンゾボロキソール型レセプター/機能性色素固定化オプティカルグルコースセンシングフィルムの開発, 日本分析化学会第62年会, 2013, 9/12, 近畿大学, 大阪.

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