

N-9

温度揺らぎに耐性を持つフェニルボロン酸含有型グルコース応答性ゲルの創製

Phenylboronate Based Glucose-responsive Gel with Enhanced Tolerance to Temperature Fluctuation

○湯浅舞¹, 松元亮², 星徹³, 澤口孝志³, 宮原裕二²*Mai Yuasa¹, Akira Matsumoto², Toru Hoshi³, Takashi Sawaguchi³, Yuji Miyahara²

Abstract: The aim of this study is to develop a glucose-induced insulin delivery gel, the property of which is less sensitive to the fluctuation of temperature for safer treatment of diabetes. This goal was achieved by optimizing the feed amount of phenylboronic acid (PBA)-bearing monomer 4-(2-acrylamidoethyl-carbamoyl)-3-fluoro PBA serving as a glucose-sensitive moiety along with additional anionic charges of 2-carboxylisopropylacrylamide. This improvement may aid in both easing the handling of the material as well as securing the safer operation.

1. 緒言

糖尿病は日本だけでなく世界的にも患者数の増加が確認されている。しかしながらその治療法はインスリン頻回注射やインスリンポンプのように厳密な血糖値コントロールが困難なものが一般的である。また、治療の性質から急激な血糖値変化に対応できず、インスリン過剰投与による低血糖を忌憚する帰結として慢性的な高血糖を脱しないものである。そのため、インスリン放出の際、血糖値に応じた量のインスリンを供給できるような自律型のインスリン放出制御が求められている。

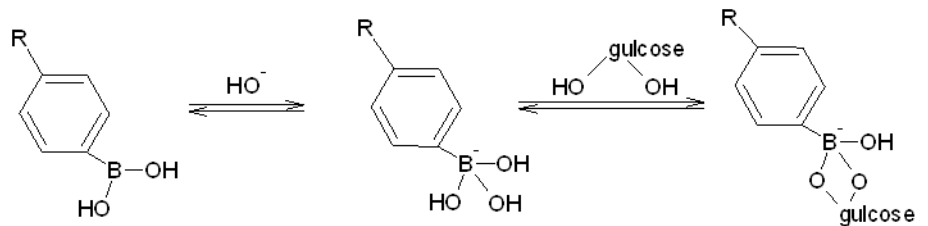


Figure 1 Glucose-dependent equilibria of phenylboronic acid

我々はこれまで、フェニルボロン酸(PBA)が多価水酸基化合物と水中で可逆的に結合すること (Figure 1) を利用したグルコース応答性ゲルを検討してきた^[1]。現状の PBA ゲルでは主鎖として温度応答性ポリマーである N-イソプロピル(メタクリルまたはアクリル)アミドを用いるため、その挙動が外部温度の変化に大きく左右されてしまう。本研究では「使用環境の温度変化に耐性を持つ新たな PBA ゲルの創製」を目的とし、主鎖に N-イソプロピルアクリルアミド (NIPAAm), また新たな親水性モノマーとして 2-カルボキシイソプロピルアクリルアミド (CIPAAm)^[2]を導入し、これらの組成を最適化することで目的の材料を探索した。

2. 実験

今回作成する PBA ゲルのモノマー構造を Figure 2 に示した。作成した PBA ゲルの組成は Table 1 に示した。内径 0.98 mm のガラスキャピラリー中でラジカル重合を行い、洗浄後、種々グルコース濃度下で温度を制御しながら平衡膨潤状態を観測することで相図を得た。

また、作成した PBA ゲルを用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるインスリンの放出実験を行った (Figure 3)。まず、Fluorescein isothianete (FITC) 修飾インスリンを 1.3 mg/mL の濃度で D-PBS 溶液に溶かした。この溶液に作成した PBA ゲルを入れた状態で、4 °C 下に 2 時間以上置き、ゲル内にインスリンを充填した。その後、37 °C で 0.1 M 塩酸につけ、1 時間インキュベートし、ゲル内部にインスリンを封入した。このゲルをカラム内に充填し、HPLC のプログラムによって任意のグルコース濃度の D-PBS 溶液を 1 mL/min の流速で流した。流れている溶液のグルコース濃度を RI で、FITC 修飾インスリンを蛍光強度で測定した。これらの結果について報告する。

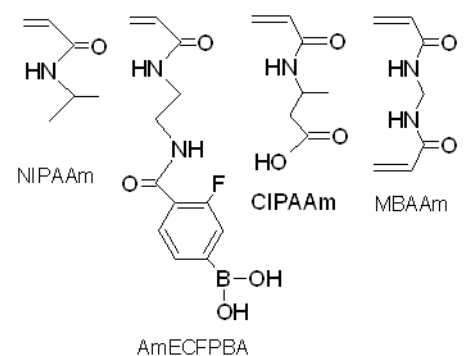


Figure 2 Structure of PBA gel monomer

1 : 日大理工・院(前)・応化 2 : 東医歯大生材研バイオエレクトロニクス分野 3 : 日大理工・教員・応化

3. 結果

AmECFPBA は疎水性モノマーであるため、ゲル中に過剰に導入するとゲルが膨潤しなくなる。従来の組成のゲルでは AmECFPBA の含率は 7.5 mol% が上限であったが、今回の検討では 20 mol% のものを評価した。Figure 3 に様々な CIPAAm 含率で調製したゲルの相図を示した。主鎖である NIPAAm が温度依存性を持つため、ゲルの体積は温度に対して負の依存性を示す。しかし、A-C1 の相図に関しては温度に対して、依存性がごく僅かである。また、グルコース濃度への依存性も少ない。グルコース濃度依存的な体積変化は A-C2, A-C3 が鋭敏である。

しかしながら、A-C2 は HPLC によるインスリン放出実験の結果、37 °C においてオフセット時にインスリンが漏れ出していた。これは、疎水性モノマーである AmECFPBA の含率に対して、親水性モノマーである CIPAAm の含率が過剰であったために親水的なゲルとなり、収縮しづらいゲルになったためであると考えられる。対して A-C1 は 37 °C において、ベースラインに極端な低下が見られないため、オフセット時のインスリンの漏れはほぼないものと考えられる。また、38 °C においても 37 °C とほぼ同様の挙動を示している。35 °C においてはやや放出量が多いが、グルコース濃度に対しては鋭敏な応答が得られた。これは、親水性モノマーである CIPAAm の追加により、疎水性モノマーである AmECFPBA の含率を大幅に増大することに成功したためであると考えられる。

4. 結言

A-C1 は温度依存性は僅かだが、グルコース濃度依存性は極めて鋭敏なゲルであった。これは親水性モノマーとして CIPAAm を追加したことで、AmECFPBA の含率を 20 mol% まで増大できたためであると考えられる。また、CIPAAm の含率が 1 mol% 増大した A-C2 はオフセット時にインスリンが漏れ出していた。これは、親水性モノマー (CIPAAm) の含率が増大したことにより、ゲルが親水性を増したため収縮しづらくなったためであると考えられる。

今後は A-C1 に関してより低温や高温でのインスリン放出挙動の確認などを行う。

5. 参考文献

[1] A. Matsumoto, *et al.* : 「A Synthetic Approach Toward a Self-Regulated Insulin Delivery System」, *Angew. Chem. Int. Ed.*, Vol. 51, pp.2124-2128, 2012.
 [2] M. Ebara, *et al.* : 「Introducing Reactive Carboxyl Side Chains Retains Phase Transition Temperature Sensitivity in N-Isopropylacrylamide Copolymer Gels」, *Macromolecules*, Vol. 33, pp.8312, 2000.

Table 1 Composition of the gel monomer

名称	NIPAAm (mol%)	CIPAAm (mol%)	AmECFPBA (mol%)
A-C1	79	1	20
A-C2	78	2	20
A-C3	77	3	20

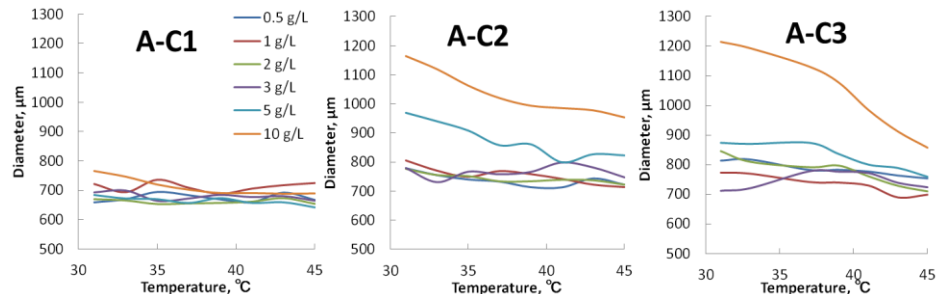


Figure 3 Phase diagram of the gel showing the equilibrium diameter changes as a function of temperature for various glucose concentrations at pH 7.4

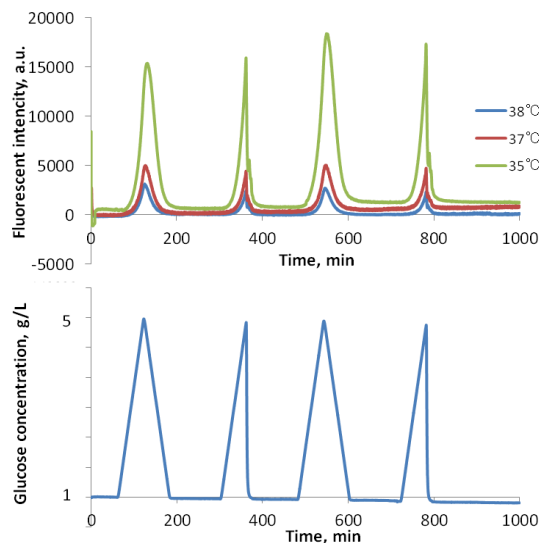


Figure 4 Detailed kinetics of the release of insulin from the gel of A-C1 at pH 7.4, 37 °C
 (Top) time-course change in fluorescence intensity of FITC-labeled bovine insulin released from the gel
 (Bottom) temporal pattern of glucose concentration