

グルコース応答性ポロン酸ポリマーの開発と
分子的人工的臍島への応用

(課題番号07559020)

平成7年度～平成9年度科学研究費補助金
(基盤研究(A)(2))
研究成果報告書

平成10年3月



研究代表者 桜井靖久
(東京女子医科大学 医学部 教授)

ABSTRACTS OF RESEARCH PROJECT, GRANT-IN-AID
FOR SCIENTIFIC RESEARCH (1997)

1. RESEARCH INSTITUTION NUMBER: 32653
2. RESEARCH INSTITUTION: Tokyo Women's Medical College
3. CATEGORY: Grant-in-Aid for Scientific Research (A) (2)
4. TEAM OF PROJECT: (1995-1997)
5. PROJECT NUMBER: 07559020
6. TITLE OF PROJECT: Preparation of Glucose-Responsive Phenylboronic Acid-Containing Polymers and Their Application to Artificial Pancreas
7. HEAD INVESTIGATOR: 20019927: Yasuhisa Sakurai, Tokyo Women's Medical College, Institute of Biomedical Engineering, Professor
8. INVESTIGATORS: (1) 00130237: Teruo Okano, Tokyo Women's Medical College, Institute of Biomedical Engineering, Professor
(2) 40277132: Takao Aoyagi, Tokyo Women's Medical College, Institute of Biomedical Engineering, Assistant Professor
(3) 40266820: Akihiko Kikuchi, Tokyo Women's Medical College, Institute of Biomedical Engineering, Research Assistant Professor

9. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

A new "Intelligent" polymer system sensitive to glucose concentration have been studied as a candidate material for chemically regulated insulin release system. Phenylboronic acid is capable to form reversible binding with cis-diol substances. Glucose responsive insulin release system has been studied with utilization of phenylboronic acid polymers for the key material to exchange reaction between gluconic acid modified insulin (G-Ins) and glucose molecule. Complexation of various diol-containing molecules with PBA gel beads [poly(3-methacrylamidophenylboronic acid-co-acrylamide-co-N,N'-methylenebis-(acrylamide))] was evaluated using frontal chromatography at pH 8.5. The structural features of the diol-containing molecules strongly influenced their binding to PBA gel beads. In particular, open-chain mono saccharides demonstrated higher association constants (ca. 9.5×10^2 to 5.1×10^3 l/mol) than glucose (ca. 6.3×10^2 l/mol). G-Ins was synthesized, and was bound onto PBA gel column. Then, the G-Ins release profile in response to varying glucose concentrations was investigated at pH 8.5. The released concentration of G-Ins from the polymer was pulsatile in response to the repeated stepwise concentration changes of glucose. Other remarkable results are that the linearity between glucose concentration and peak height of released G-Ins, and that the release response have no lag time to change of glucose concentration. To enhance binding between PBA and glucose under physiological pH 7.4, an amine component was incorporated into the polymer chain along with PBA [poly(3-methacrylamidophenylboronic acid-co-N,N'-dimethylaminopropylacrylamide-co-acrylamide-co-N,N'-methylenebis(acrylamide))]. The proportion of the amount of PBA groups complexed with glucose versus total amount of PBA groups was determined by batch method. Compared to PBA copolymer synthesized without the amine component, the proportion increased as a function of the amine content and the pH of the buffer. These results confirm that the interaction of neighboring amines (unprotonated) with PBA strengthens the binding with glucose, especially at pH 7.4 and above. Release property of G-Ins from the amine-containing PBA gel beads at pH 7.4 was evaluated using a liquid chromatography system. Amine-containing PBA gel showed less rapid decrease of G-Ins in the column under buffer-rinse over PBA gel. The released amount of G-Ins from amine-containing PBA gel is much greater than for the PBA gel, responding to the addition of glucose at physiological pH. The results from long-term release studies demonstrate that the amine-containing PBA gel has the capability to respond to glucose challenge over 120 hours. Furthermore, a linearity of released G-Ins was observed with glucose concentration. These results demonstrate the feasibility of an insulin-responsive system to achieve insulin release in response to glucose under physiological conditions.

10. KEY WORDS

- (1) Phenylboronic acid (2) Glucose (3) Insulin delivery (4) Artificial pancreas
(5) Polymer complex (6) intelligent materials (7) Physiological pH

(CONTINUE TO NEXT PAGE)

11. REFERENCES

AUTHORS, TITLE OF ARTICLE	JOURNAL, VOLUME-NUMBER, PAGES CONCERNED, YEAR
Kazunori Kataoka, Issei Hisamitsu, Naoko Sayama, Teruo Okano, Yasuhisa Sakurai, Novel sensing for glucose based on the complex formation between phenylborate and fluorescent diol compounds	Journal of Biochemistry, 117, 1145-1147 (1995)
Daijiro Shiino, Yoshishige Murata, Akira Kubo, Yong Joo Kim, Kazunori Kataoka, Yoshiyuki Koyama, Akihiko Kikuchi, Masayuki Yokoyama, Yasuhisa Sakurai, Teruo Okano, Amine containing phenylboronic acid gel for glucose-responsive insulin release under physiological pH	Journal of Controlled Release, 37, 269-276 (1995)
Akihiko Kikuchi, Ken Suzuki, Osamu Okabayashi, Hiroshi Hoshio, Kazunori Kataoka, Yasuhisa Sakurai, Teruo Okano, Glucose-sensing electrode coated with polymer complex gel containing phenylboronic acid	Analytical Chemistry, 68, 823-828 (1996)
Daijiro Shiino, Akira Kubo, Yoshishige Murata, Yoshiyuki Koyama, Kazunori Kataoka, Akihiko Kikuchi, Yasuhisa Sakurai, Teruo Okano, Amine effect on phenylboronic acid complex with glucose under physiological pH in aqueous solution	Journal of Biomaterial Science, 7, 697-705 (1996)
Takeshi Ikeya, Hiroaki Miyazaki, Kazunori Kataoka, Teruo Okano, Yasuhisa Sakurai, Activation of lymphocytes by poly(N-vinylpyrrolidone-alt-maleic acid) derivatized with phenylboronic acid	Journal of Japanese Society for Biomaterials, 14, 260-266 (1996)
Takashi Aoki, Yayoi Nagao, Kohei Sanui, Naoya Ogata, Akihiko Kikuchi, Yasuhisa Sakurai, Kazunori Kataoka, Teruo Okano, Glucose-sensitive lower critical solution temperature changes of copolymers composed of N-isopropylacrylamide and phenylboronic acid moieties	Polymer Journal, 25, 371-374 (1996)
Issei Hisamitsu, Kazunori Kataoka, Teruo Okano, Yasuhisa Sakurai, Glucose-responsive gel from phenylborate polymer and poly(vinyl alcohol): prompt response at physiological pH through the interaction of borate with amino group in the gel	Pharmaceutical Research, 14, 289-293 (1997)

科学研究費補助金による研究成果の図書・雑誌等報告書

フリガナ

サクライヤスヒサ

- 1.研究代表者 (所属研究期間・所属部局・職) : 桜井 靖久 (東京女子医科大学・医学部・教授)
- 2.研究課題名 (研究種目名) : グルコース応答性ボロン酸ポリマーの開発と分子的人工臓器への応用 (基盤研究(A)(2))
- 3.交付総額 : 10,800千円 (研究期間:平成7年度~平成9年度)

4.研究発表

雑誌論文	著者名	K. Kataoka, I. Hisamitsu, N. Sayama, T. Okano, Y. Sakurai	論文課題	Novel sensing for glucose based on the complex formation between phenylborate and fluorescent diol compounds		
	雑誌名	Journal of Biochemistry	巻	発行年	ページ	
			117	1 9 9 5	1145-1147	

雑誌論文	著者名	D. Shiino, Y. Murata, A. Kubo, Y. J. Kim, K. Kataoka, Y. Koyama, A. Kikuchi, M. Yokoyama, Y. Sakurai, T. Okano	論文課題	Amine containing phenylboronic acid gel for glucose-responsive insulin release under physiological pH		
	雑誌名	Journal of Controlled Release	巻	発行年	ページ	
			37	1 9 9 5	269-276	

雑誌論文	著者名	A. Kikuchi, K. Suzuki, O. Okabayashi, H. Hoshino, K. Kataoka, Y. Sakurai, T. Okano	論文課題	Glucose-sensing electrode coated with polymer complex gel containing phenylboronic acid		
	雑誌名	Analytical Chemistry	巻	発行年	ページ	
			68	1 9 9 6	823-828	

雑誌論文	著者名	D. Shiino, A. Kubo, Y. Murata, Y. Koyama, K. Kataoka, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano	論文課題	Amine effect on phenylboronic acid complex with glucose under physiological pH in aqueous solution		
	雑誌名	Journal of Biomaterial Science	巻	発行年	ページ	
			7	1 9 9 6	697-705	

機関番号	研究者番号	課題番号
3 2 6 5 3	2 0 0 1 9 9 2 7	0 7 5 5 9 0 2 0

科学研究費補助金による研究成果の図書・雑誌等報告書

フリガナ

サクライヤスヒサ

- 1.研究代表者 (所属研究期間・所属部局・職) : 桜井靖久 (東京女子医科大学・医学部・教授)
- 2.研究課題名 (研究種目名) : グルコース応答性ポロン酸ポリマーの開発と分子的人工臓島への応用 (基盤研究(A)(2))
- 3.交付総額 : 10,800千円 (研究期間:平成7年度~平成9年度)

4.研究発表

雑誌論文	著者名	池谷武志、宮崎浩明、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久	論文課題	ポロン酸基を有するN-ビニルピロリドンと無水マレイン酸共重合体によるリンパ球の増殖誘導				
	雑誌名	生体材料	巻	発行年			ページ	
			14	1	9	9	6	260-266

雑誌論文	著者名	T.Aoki, Y. Nagao, K. Sanui, N. Ogata, A. Kikuchi, Y. Sakurai, K. Kataoka, T. Okano	論文課題	Glucose-sensitive lower critical solution temperature changes of copolymers composed of N-isopropylacrylamide and phenylboronic acid moieties				
	雑誌名	Polymer Journal	巻	発行年			ページ	
			25	1	9	9	6	371-374

雑誌論文	著者名	I. Hisamitsu, K. Kataoka, T. Okano, Y. Sakurai	論文課題	Glucose-responsive gel from phenylborate polymer and poly(vinyl alcohol): prompt response at physiological pH through the interaction of borate with amino group in the gel				
	雑誌名	Pharmaceutical Research	巻	発行年			ページ	
			14	1	9	9	7	289-293

機関番号					研究者番号							課題番号								
3	2	6	5	3	2	0	0	1	9	9	2	7	0	7	5	5	9	0	2	0

はしがき

本研究報告書は、平成7年度、8年度、および平成9年度文部省科学研究費補助金(基盤研究(A)(2)) (課題番号07559020)によりおこなった、「グルコース応答性ポロン酸ポリマーの開発と分子的人工膜島への応用」に関する成果をまとめたものである。

本研究の遂行にあたり、東京理科大学基礎工学部 片岡一則教授、東京電機大学工学部 星野洋教授、日本油脂株式会社筑波研究所 村田敬重氏、椎野太二郎博士のご助力を得たことを付記し、ここに感謝いたします。

平成9年度科学研究費補助金（基盤研究（A）（2））研究成果報告書

課題名： グルコース応答性ボロン酸ポリマーの開発と分子的人工臓器への応用

課題番号： 07559020

研究組織：

研究代表者：桜井靖久（東京女子医科大学・医学部・教授）

研究分担者：岡野光夫（東京女子医科大学・医学部・教授）

研究分担者：青柳隆夫（東京女子医科大学・医学部・講師）

研究分担者：菊池明彦（東京女子医科大学・医学部・助手）

研究経費：

平成7年度 5,600,000 円

平成8年度 2,700,000 円

平成9年度 2,500,000 円

計 10,800,000 円

研究発表

(1) 学会誌等

(1) K. Kataoka, I. Hisamitsu, N. Sayama, T. Okano, Y. Sakurai

Novel sensing for glucose based on the complex formation between phenylborate and fluorescent diol compounds

Journal of Biochemistry, 117, 1145-1147 (1995) (平成7年1月)

(2) D. Shiino, Y. Murata, A. Kubo, Y. J. Kim, K. Kataoka, Y. Koyama, A. Kikuchi,

M. Yokoyama, Y. Sakurai, T. Okano

Amine containing phenylboronic acid gel for glucose-responsive insulin release under physiological pH

Journal of Controlled Release, 37, 269-276 (1995) (平成7年5月)

(3) A. Kikuchi, K. Suzuki, O. Okabayashi, H. Hoshio, K. Kataoka, Y. Sakurai, T. Okano

Glucose-sensing electrode coated with polymer complex gel containing phenylboronic acid

Analytical Chemistry, 68, 823-828 (1996) (平成8年3月)

(4) D. Shiino, A. Kubo, Y. Murata, Y. Koyama, K. Kataoka, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano
Amine effect on phenylboronic acid complex with glucose under physiological pH in aqueous
solution

Journal of Biomaterial Science, 7, 697-705 (1996) (平成8年)

(5) 池谷武志、宮崎浩明、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久

ボロン酸基を有するN-ビニルピロリドンと無水マレイン酸共重合体によるリンパ球
の増殖誘導

生体材料、14、260-266 (1996) (平成8年12月)

(6) T. Aoki, Y. Nagao, K. Sanui, N. Ogata, A. Kikuchi, Y. Sakurai, K. Kataoka, T. Okano
Glucose-sensitive lower critical solution temperature changes of copolymers composed of
N-isopropylacrylamide and phenylboronic acid moieties

Polymer Journal, 25, 371-374 (1996) (平成8年10月)

(7) I. Hisamitsu, K. Kataoka, T. Okano, Y. Sakurai

Glucose-responsive gel from phenylborate polymer and poly(vinyl alcohol): prompt response at
physiological pH through the interaction of borate with amino group in the gel

Pharmaceutical Research, 14, 289-293 (1997) (平成9年12月)

(2) 口頭発表

(1) 宮崎浩明、笹川剛紀、宮地和彦、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久

グルコース応答型および感温性コアセルベート形成能を有するボロン酸ポリマー
自律応答材料シンポジウム、94-95 (1995) (平成7年1月、つくば)

(2) 鈴木 憲、岡野光夫、桜井靖久、岡林 理、星野 洋、片岡一則

ボロン酸基を利用した非酵素グルコースセンサーの開発

第24回医用高分子シンポジウム、9-10 (1995) (平成7年6月、東京)

(3) 内村英一郎、宮崎浩明、片岡一則、岡野光夫

新規アミノ基含有ボロン酸ポリマーによるリンパ球の増殖誘導の増強

第44回高分子学会年次大会、44、426 (1995) (平成7年5月、横浜)

(4) 笹川剛紀、宮崎浩明、片岡一則、岡野光夫

グルコース応答性部位としてボロン酸基を有するLCSTゲルの調製とその膨潤・収縮挙動の解析

第44回高分子学会年次大会、44、479(1995) (平成7年5月、横浜)

(5) 久光一誠、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久

グルコース応答性高分子間コンプレックス [VII] UVおよび¹¹B-NMRによるボロン酸基/多価水酸基間コンプレックス形成におけるアミノ酸導入効果の確認

第44回高分子学会年次大会、44、479(1995) (平成7年5月)

(6) 久光一誠、小里達也、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久

グルコース応答型高分子間コンプレックス [9] –ボロン酸基含有高分子とポリビニルアルコール間の高分子間コンプレックスゲルのグルコースに応答した膨潤収縮挙動におけるアミノ基の効果–

第44回高分子討論会、44、1664-1665(1995) (平成7年9月、大阪)

(7) 内村英一郎、宮崎浩明、片岡一則、岡野光夫

新規アミノ基含有ボロン酸ポリマーによるリンパ球の増殖誘導の増強

第17回日本バイオマテリアル学会大会、122(1995) (平成7年10月、東京)

(8) 青木隆史、讃井浩平、緒方直哉、菊池明彦、岡野光夫、桜井靖久、片岡一則

ボロン酸基含有ポリマーにより誘導された培養細胞の組織構築

第33回日本人工臓器学会大会、S-42(1995) (平成7年11月、大阪)

(9) 文箭将之、宮崎浩明、片岡一則、桜井靖久、岡野光夫

グルコース応答性ボロン酸基含有ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)ゲルの膨潤-収縮及びその薬物放出挙動の解析

第45回高分子学会年次大会、45、396(1996) (平成8年5月27日～9日、名古屋)

(10) 久光一誠、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久

グルコース応答型高分子間コンプレックス[11] –粘性測定によるボロン酸基/多価水酸基間コンプレックス形成におけるアミノ基導入効果の確認–

第45回高分子学会年次大会、45、395(1996) (平成8年5月27日～29日、名古屋)

- (11) 文箭将之、宮崎浩明、片岡一則、桜井靖久、岡野光夫
グルコース応答性体積相転移を示すボロン酸含有ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) ゲルの調整とその薬物放出挙動の解析
高分子討論会、45、1802-1803 (1996) (平成8年10月1日～3日、広島)
- (12) 久光一誠、田中清人、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久
ボロン酸基/多価水酸基間結合形成を利用したグルコース応答膨潤収縮ゲル-アミノ基導入とIPM化による応答制御-
高分子討論会、45、1818-1819 (1996) (平成8年10月1日～3日、広島)
- (13) 宮崎浩明、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久
グルコースに反応してLCST変化を示すボロン酸残基含有ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) の合成およびその相転移挙動の解析
高分子討論会、45、1882-1883 (1996) (平成8年10月1日～3日、広島)
- (14) 宮崎浩明、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久
グルコース応答性コアセルベート形成能を有するボロン酸含有ポリジメチルアクリルアミド誘導体
高分子討論会、45、1884-1885 (1996) (平成8年10月1日～3日、広島)
- (15) 宮崎浩明、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久
ボロン酸残基含有高分子によるリンパ球の増殖誘導およびその活性化メカニズム
高分子討論会、45、1886-1887 (1996) (平成8年10月1日～3日、広島)
- (16) 内村英一郎、宮崎浩明、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久
人工レクチン能を有するボロン酸基含有ポリマーへのアミノ基の導入によるリンパ球増殖活性の増強
人工臓器、25、79 (1996) (平成8年10月2日～4日、東京)
- (17) 文箭将之、宮崎浩明、片岡一則、桜井靖久、岡野光夫
グルコース応答性耐性相転移を示すボロン酸基含有ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) ゲルの調整とその薬物放出挙動の解析
高分子ゲル研究討論会、15-16 (1997) (平成9年1月13日～14日)
- (18) 内村英一郎、宮崎浩明、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久

人工レクチン能を有するボロン酸基含有ポリマーへのアミノ基の導入によるリンパ球増殖活性の増強

日本人工臓器学会、26、472-475 (1996) (平成9年)

(19) 久光一誠、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久

ボロン酸基と多価水酸基間の可逆的な共有結合形成を利用したグルコース応答型膨潤収縮ゲル

インテリジェント材料シンポジウム、103-104 (1996) (平成9年3月21日、東京)

(20) 池谷武志、宮崎浩明、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久

ボロン酸基を有するN-ビニルピロリドンと無水マレイン酸共重合体によるリンパ球の増殖誘導

日本バイオマテリアル学会、14、260-266 (1996) (平成8年)

(21) 文箭将之、宮崎浩明、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久

グルコース応答性ボロン酸基含有高分子ゲルの調整と薬物放出制御

高分子学会年次大会、46、570 (1997) (平成9年5月24日～26日、東京)

(22) 内村英一郎、宮崎浩明、片岡一則、岡野光夫、桜井靖久

ボロン酸含有ポリマーからなる人工レクチンの設計：リンパ球増殖活性化におよぼすインターロイキン2によるアジュバンド活性の評価

第35回日本人工臓器学会、26、S-55 (1997) (平成9年9月14日～15日、横浜)

2) 国際学会

(1) H. Miyazaki, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka

Lectin-mimicking functional polymer: boronate-containing polymer as synthetic mitogen for lymphocytes

5th World Biomaterials Congress, Transaction, 2, 844 (1996) (平成8年5月29日～6月2日、トロント、カナダ)

(3) 出版物

なし

I. 序論

I-1: 研究方針

近年、検知、判断、作動という3つの連携する機能を持つ分子デバイスが自律応答材料として様々な分野で盛んに研究されている。薬学の分野では自律応答材料はその機能が特に注目されており、①外界からの刺激（健康状態）を検出し、②（薬物が必要か）判断し、③作動（薬物を放出）するフィードバック・メカニズムを有する革新的な薬物投与システムを達成しうる材料として期待されている。

本研究は中でも特に薬物の必要とする量の日内変動が大きい"インシュリン依存型糖尿病(IDDM)"の患者に対して行われるインシュリンの投与を、安全かつ効果的にする目的で、自律応答材料を用いたシステムを追求した。IDDM患者への理想的なインシュリンの投与とは、血糖値の日内変動に応じた量のインシュリンを連続して投与することであり、本研究では、この糖濃度応答性インシュリン放出システムを自律応答材料によって実現しようとする新しい試みである。具体的には、このシステムを達成するために、糖等の多価水酸基化合物とコンプレックス形成、解離、置き換わり反応を起こすことで知られているフェニルボロン酸(PBA)基を自律応答性を示す機能性側鎖として用いて検討を行った(図I-1)。

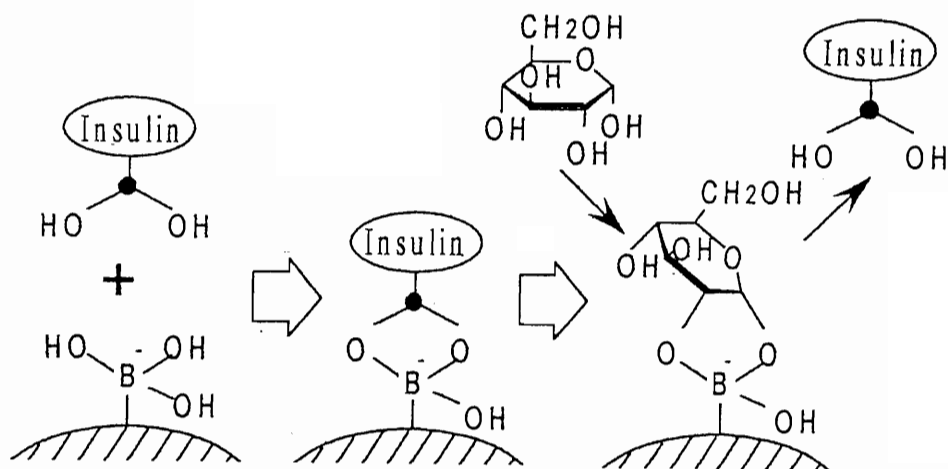


図 I - 1 PBA 基を有する材料を用いた糖濃度応答性インシュリン放出システムのメカニズム

II-2: IDDM治療のためのインシュリン投与

体内でのインシュリン分泌動態¹⁾や薬理動態^{2,3)}が解明されるにつれ、食後のインシュリンの追加分泌と、食間の基礎分泌、という健常者に見られるインシュリンの分泌パターンをIDDM患者に実現するためには、インシュリン頻回注射療法が好ましい。インシュリン頻回注射療法は各食前に速効性インシュリンを投与するとともに、基礎分泌を補うため

に中間型または持続型のインシュリンを1日1~2回投与する方法で(図I-2)、生体のインシュリン分泌(図I-3)に似かよったインシュリンの血中濃度が実現できる。この方法では、1日3~4回の注射が必要であるほか、より厳格な血糖コントロールを目指すために血糖自己測定が必要である。実際、1985年以降は、ペン型インシュリン注入器や、混合型インシュリン製剤の登場によってインシュリン自己注射の煩雑さや手間が改善され、インシュリン頻回注射療法が浸透していった^{4,5)}。しかしながら、これらの方法は血糖の実測値ではなく予想値をもとにインシュリンを注射することが問題であった。

血糖の予想値を誤って過剰のインシュリン投与を行い血糖値が70 mg/dl以下になると、交感神経系が麻痺し低血糖性昏睡となり、最悪の場合死に至ることがある。一方で、慢性的な高血糖は糖尿病の合併症を引き起こす。糖尿病の合併症としては糖尿病性網膜症(失明することもある)、糖尿病性壊疽(手足の切断を余儀なくされることもある)、腎症(血液透析や腎移植が必要になる)、粥状硬化症、心筋症、皮膚病変、糖尿病性神経障害、末梢血管病変が挙げられ⁶⁾、合併症が軽視できない病気であることが理解できる。このような合併症の発症、進展阻止には厳格な血糖コントロールが必要であるといわれている。

これらの問題を解決するために、最近では、皮下に留置したグルコースセンサーで患者の血糖を連続的にモニタリングし、至適量のインシュリンを連続注入する携帯型のいわゆる人工膵臓が検討されている^{7,8)}。このシステムはかなり好ましいインシュリン投与が可能であるが、グルコースセンサーの寿命が数日と短いことから、グルコースセンサーの長期使用に関する検討が行われている⁹⁾。また、グルコースセンサーとインシュリン注入針からの感染症の問題が残っている。

ここまでに記載したインシュリン投与とは異なる試みのIDDM治療として、膵臓移植が挙げられる。膵臓移植は世界で3,000例以上行われ、移植膵の1年生着率は70%を越えている¹⁰⁾。膵臓は内分泌と外分泌を司る臓器であり、インシュリンを分泌するランゲルハンス島β細胞は内分泌の一部である。よって移植した臓器から分泌されるリパーゼなど外分泌腺を膀胱や腸へつないで、外分泌液を問題が起こらないところへ逃がさなくてはならない。また、IDDM発症過程で膵島細胞質抗体¹¹⁾や、膵島細胞膜抗体¹²⁾が出現することから、他の臓器に比べて移植が容易でない。さらに、ドナーの絶対的な不足も問題である。

これに対して、各種動物のランゲルハンス島をマイクロカプセルに封入し、生体内に移植する試みは、免疫に関与する抗体を通さず、グルコースやインシュリンを通すことができる半透膜を設計できれば、同種間移植のみならず異種間移植が可能になるため、盛んに研究が行われている¹³⁻¹⁶⁾。

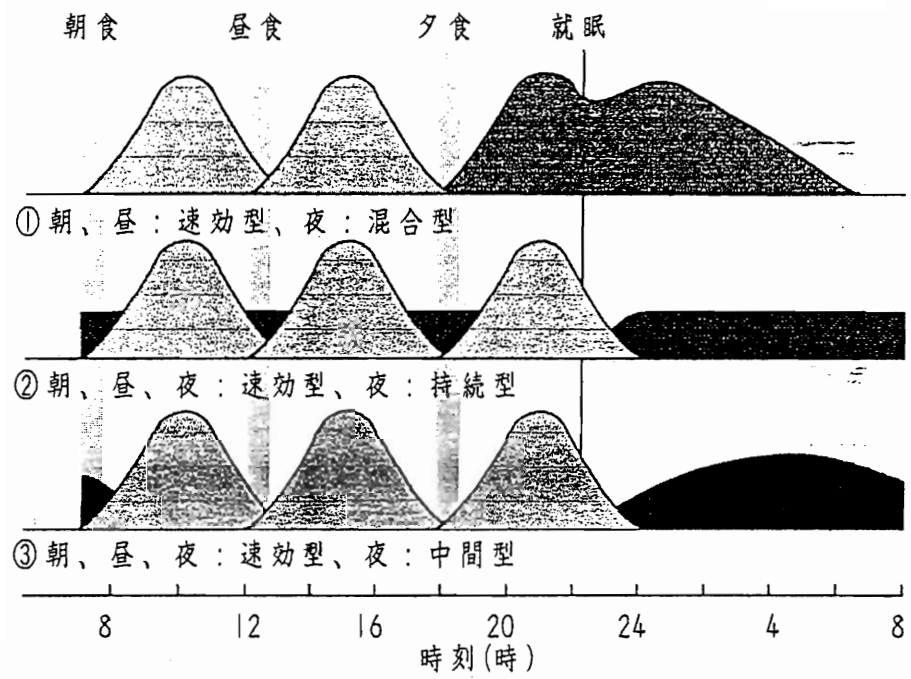


図 I - 2 インシュリン頻回注射療法の各種処方例¹⁾

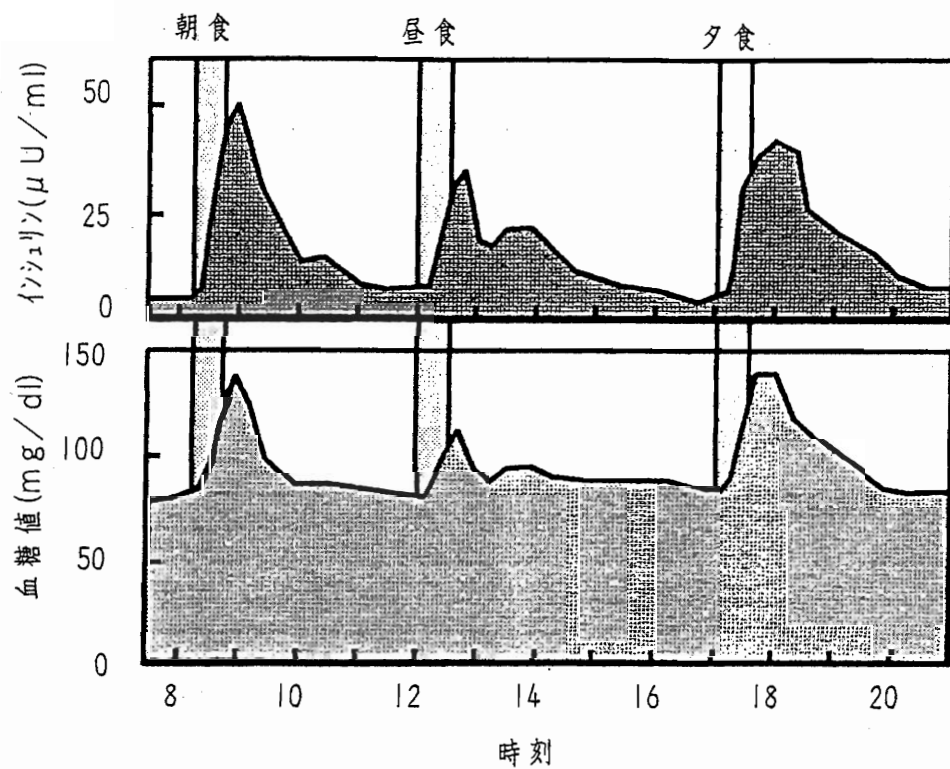


図 I - 3 健常者の血糖値の変化と血中インシュリン濃度の関係⁵⁾

I-3：DDSと自律応答材料

薬物の生体内での時間的、空間的な分布（薬物の動態）は疾病の症状を軽減したり、治療する上で非常に重要な問題である。図I-4に一般的な投与方法である①静脈投与、②経口投与と、近年盛んに検討されている③スローリリース製剤、④放出制御製剤を用いて薬物を投与した場合の血中薬物濃度の変化を示す。

①静脈投与では、血中薬物濃度が薬物の効能が発揮可能な作用領域に入るように薬物量をコントロールして投与するので、投与直後の血中薬物濃度は作用領域にある。しかしながら時間の経過とともに薬物が代謝、排泄され、薬物血中濃度は減少し、図I-4中の非作用領域内ではもはや薬物の効能は期待できない¹⁷⁾。②経口投与では、投与した薬物が腸管吸収を受け、その血中薬物濃度を上昇させるまでに時間を要するが、その後の時間経過は①と同様である。これらの一般的な薬物投与方法を用いる場合は、薬物を数時間毎に投与し続け、このサイクルを繰り返すことによって血中薬物濃度を作用領域に維持し、薬物の期待される効能を発揮させている。これに対して③スローリリース製剤では、薬物放出速度が一定に保たれることが特徴であり、(a)薬物の基材からの拡散性を利用したり¹⁸⁾、(b)薬物を包埋した基材の膨潤を利用したり¹⁹⁾、(c)薬物を包埋した基材の生分解性を利用したり^{20,21)}、さらには(d)薬物を一端が細孔を有するケースに入れ、ピストンを介して他端に半透膜を設置し、浸透圧によって薬物を押し出すシステム²²⁾が研究されている。

薬物は必要な時、必要な場所（臓器、器官、細胞、等）にのみ、必要量あれば薬効を発揮させることができる。これらの観点から、近年のDDS(ドラッグ・デリバリー・システム)分野では、薬物の標的指向性を高くすることによって疾患部位に薬物を集中させる検討(ドラッグ・ターゲティング)と、刺激に応答して薬物の放出を起こさせる検討(薬物の放出制御；図I-4、④)が盛んに行われている²³⁾。

図I-5に標的指向性を有する薬物の体内分布の模式図を示す。これまでに、薬物、および薬物キャリアーの分解性や吸着性を利用して十二指腸、直腸、大腸²⁴⁾等の器官指向性薬物や、新生毛細血管での血漿漏出性を利用した癌組織指向性のある薬物²⁵⁾が知られている。しかしながら、種々の抗体や糖鎖の組織親和性を利用した標的指向性薬物が盛んに検討されてきたにもかかわらず、生体内に投与したときに標的指向性を有する化合物はきわめて少なく、ガラクトース側鎖を有する高分子化合物が知られている程度である。この化合物が肝実質細胞指向性を有する理由として、糖タンパクの代謝（糖タンパクは代謝を受けてアシアロ糖タンパクになり、末端に出現したガラクトース側鎖が肝実質細胞に認識され、細胞内に取り込まれる）経路でのガラクトースの認識がこの化合物で生起しているためと考えられている²⁶⁾。

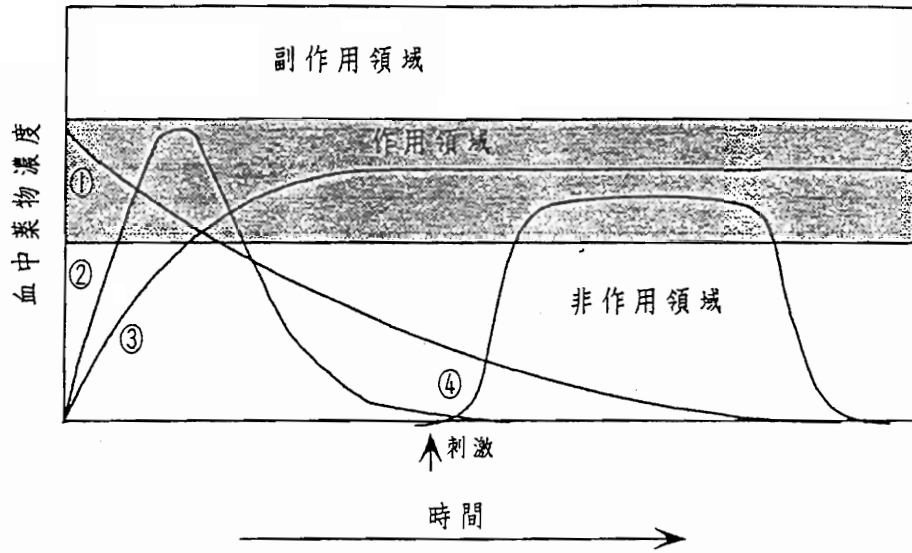


図 I - 4 投与経路の違いと製剤の種類による血中薬物濃度の時間的变化

① 静脈投与、② 経口投与、③ スローリリース製剤、④ 放出制御製剤

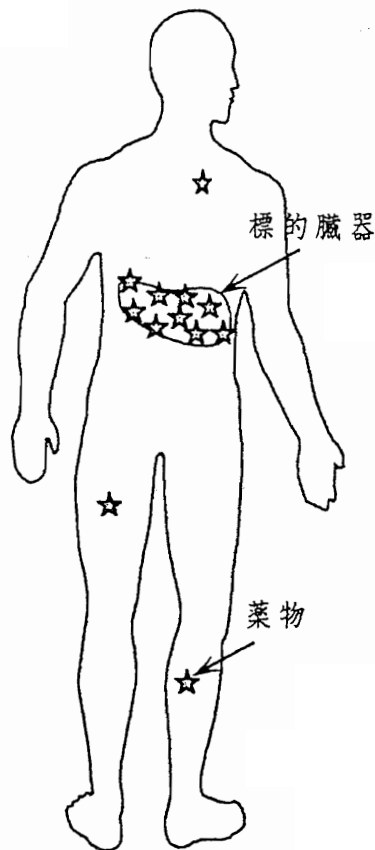


図 I - 5 標的指向性を有する薬物の体内分布の模式図

一方、薬物の放出制御に関連する取り組みは自律応答材料を用いて行われている（図I-6）。自律応答材料とは各種化合物の濃度変化²⁷⁻³²、pHの変化³³⁻³⁵、温度の変化³⁶⁻⁴⁰、電界の変化⁴¹⁻⁴³、光量の変化⁴⁴、等の外部刺激に応じて分解したり、膨潤度を変化させたり、刺激化合物と別の化合物を置換したりする材料であり、"インテリジェント材料"とも呼ばれている。図I-7に自律応答材料を用いた薬物放出制御の模式図を示す

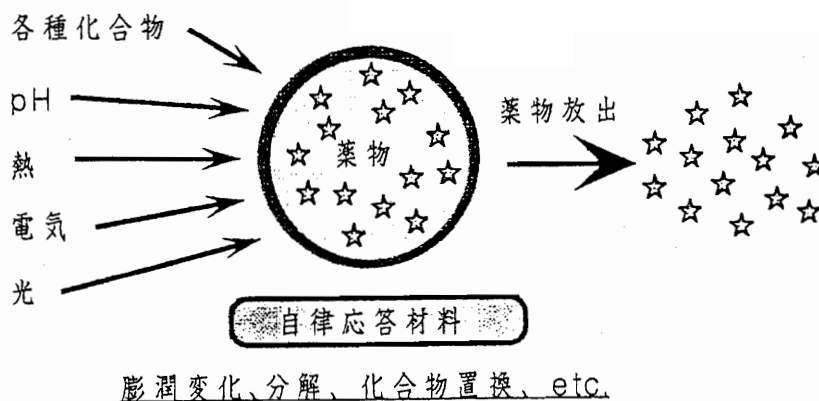


図 I - 6 自律応答材料を用いた各種刺激に対する薬物の放出

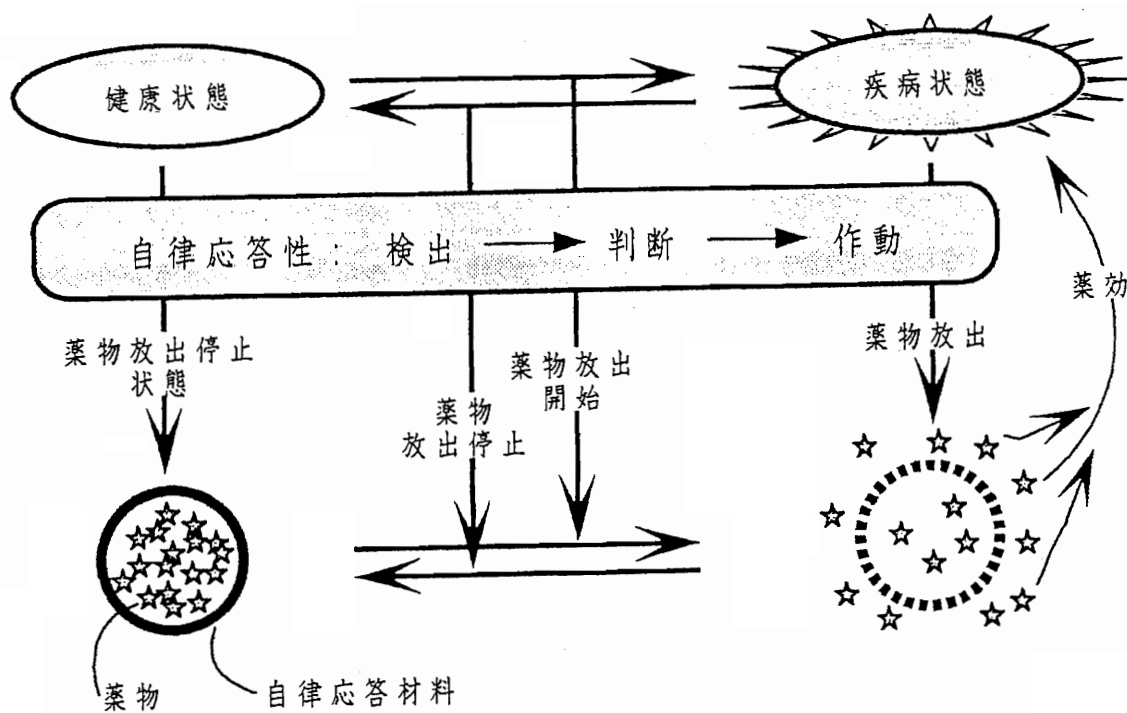


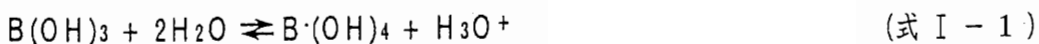
図 I - 7 自律応答材料を用いた薬物放出制御の模式図³⁸⁾

自律応答材料は外界からの刺激を常に検知し、薬物が必要か判断し、作動(薬物を放出)するフィードバック・メカニズムを有しており、生体が薬物を必要な時にのみ、必要量の薬物を生体内に送り込む機能を司る材料として有用である。IDDM患者へのインシュリン治療では、外界の刺激であるグルコースの濃度に応じてインシュリンを投与(放出)することが必要である。しかしながら、血中グルコース濃度の日内変動は非常に大きく、インシュリン投与が必要なタイミングも血中グルコース濃度に応じて極端に変化することから、自律応答材料を用いた検討が数多くなされてきた²⁷⁻³²⁾。

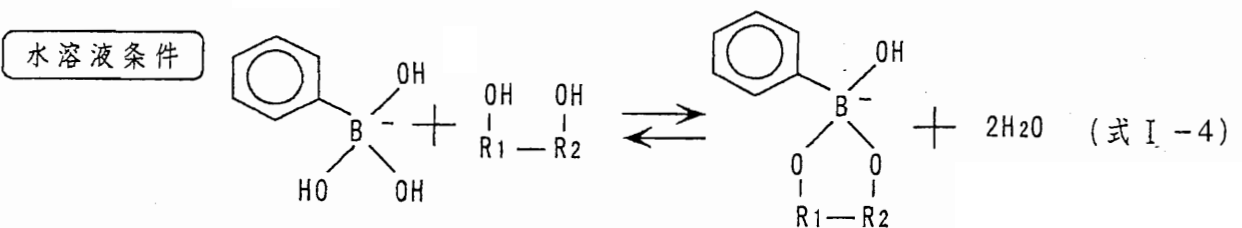
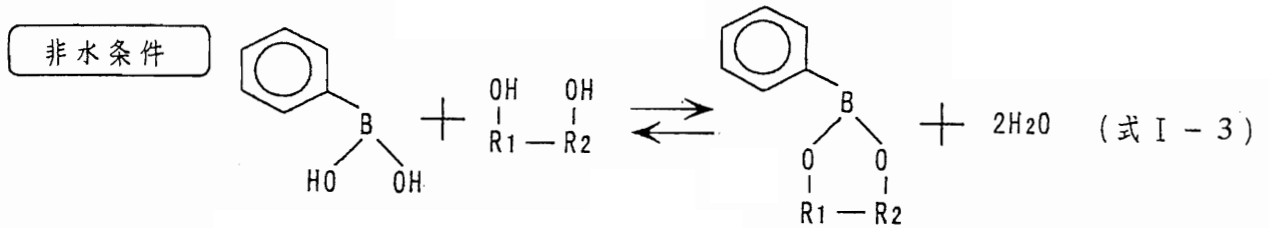
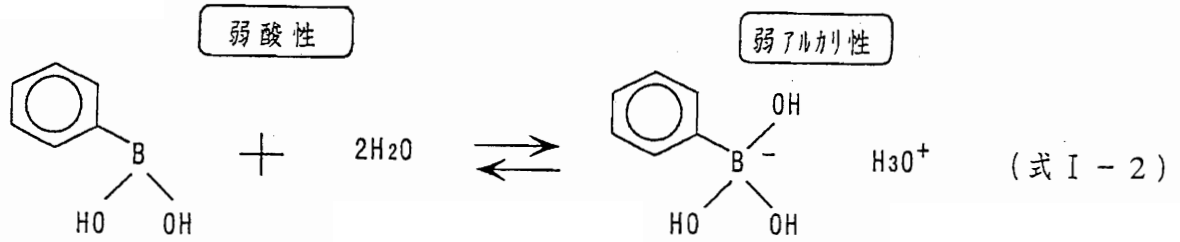
I-4: ボロン酸と多価水酸基化合物のコンプレックス形成

ホウ素は原子周期律表ではアルミニウムやガリウムなどと同様IIIbグループに属する原子番号5の原子で、3つの原子価電子を有している。しかしながら、ホウ素の性質は独特で、電子親和性が高いが金属ではなく、その化学的性質は隣接するIVb属の炭素や珪素に類似しており、窒素、炭素、イオウ、リン、酸素などの電子供与性の元素と化学反応可能である^{45,46)}。しかしながら、ほとんどのボロン誘導体が水中でホウ酸(B(OH)₃)に分解してしまう。これに対して、PBA等のアロマトミックなボロン化合物を含む数少ないボロン化合物のみが水溶液条件下で安定である⁴⁵⁾。

ホウ酸は下記に示す反応式I-1でイオン化し(pKa9.2)、配位数が3価と4価に変化する。また、ホウ酸は他の水酸基化合物と共有結合を介してコンプレックス形成することが可能であり、電導度測定^{47,48)}、pH測定⁴⁹⁾、熱量分析⁴⁹⁾、旋光度測定⁵⁰⁻⁵²⁾、NMR分析^{51,53)}、溶解度測定⁵²⁾、クロマトグラフィー⁵⁴⁾、電気泳動^{52,55)}、酵素反応性の変化⁵²⁾、X線回折⁵⁶⁾などを用いて調べられている。



PBAもホウ酸と同様に水溶液中で配位数を3価と4価に変化することができる平衡状態として存在している(式I-2)。また、PBAは水酸基を有さない有機溶媒中で系を脱水することによって、さまざまな水酸基化合物と3価の状態でコンプレックス形成が可能である^{46,57)}(式I-3)。しかしながら、3価のコンプレックスは水溶液条件下では安定に存在することができない。これは水溶液条件下では大量にある水分子によって式I-3の平衡反応を左に移行させてしまうためと考えることができる。



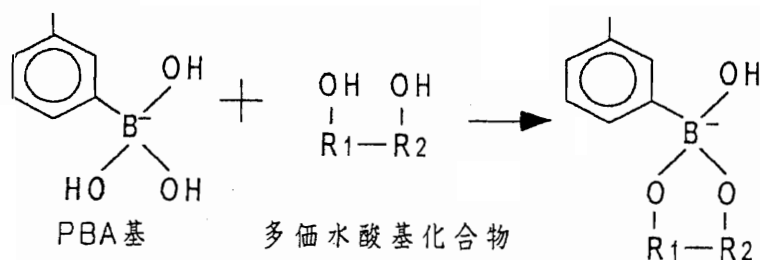
これに対して、4価状態のPBAと多価水酸基化合物(ここではコンプレックスを形成する上で立体障害のない2つ以上の水酸基を有する化合物と定義する)は水溶液中でコンプレックス(式I-4右項)を形成することができ、このコンプレックスは水溶液条件下で安定に存在することが知られている^{50,58})。この反応は平衡反応であり、コンプレックスを形成する多価水酸基化合物の種類によってPBAとの解離定数(Kd)または結合定数(Ka; 解離定数の逆数)が異なることが知られている (アドニトール: $Kd=2.2 \times 10^{-3}$ mol/l、デウルシトール: $Kd=1.1 \times 10^{-3}$ mol/l⁴⁸)、D-グルコース: $Ka=1.1 \times 10^2$ l/mol、マンニトール: $Ka=2.3 \times 10^3$ l/mol⁵⁹)。これらの値と、生体内でのコンプレックス形成としてよく知られているタンパクとリガンド分子間の解離定数($Kd=10^{-4} \sim 10^{-9}$ mol/l)を比較すると、PBAと多価水酸基化合物のコンプレックス形成はそれほど強固でないことが理解できる^{60,61})。

多価水酸基化合物とPBAのコンプレックスを形成する性質を利用して、PBA基含有化合物やPBA基含有高分子材料は、糖の分離^{62,63})、核酸の分離^{64,65})、タンパクの精製⁶⁶)、糖類修飾時の水酸基の保護⁶⁷)、細胞凝集剤^{68,69})等に応用され、精力的に検討されている。

II. PBA基を側鎖に有するポリマーへの多価水酸基化合物のコンプレックス形成能に関する検討

II-1: 緒言

PBA基はグルコース等の多価水酸基化合物と脱水、縮合し、2つの共有結合を介してコンプレックスを形成することが知られている^{50,58)}(図II-1)。この性質を利用して、各種PBA基を有するポリマーが液体クロマトグラフィ⁶⁴⁻⁶⁶⁾や鑄型重合⁶²⁾の分野で検討されている。これまでに、PBA基を側鎖に有するポリ(3-アクリルアミドフェニルボロン酸-co-N-ビニルピロリドン)が水酸基を側鎖に有するポリビニルアルコールとコンプレックスゲルを形成することが知られており、このコンプレックス形成は周辺のグルコース濃度変化によって、コントロールできることが知られている^{70,71)}。これらのことから、PBA基を有する材料は糖濃度を検知し、膨潤収縮変化や多価水酸基化合物の置換反応等によって薬物を放出する”自律応答材料”として応用可能であることが示唆された。



図II-1 PBA基と多価水酸基化合物のコンプレックス形成

本研究では、PBA基を有する材料を用いて糖濃度応答性インシュリン放出システムを構築し、詳細に検討することを目的とした。具体的には、(図II-2)①インシュリンに多価水酸基化合物を修飾し、②PBA基を有する材料に添加することによって、③PBA基とコンプレックスを形成させ、さらに、④糖を添加することによって修飾インシュリンが放出する、というメカニズムによる糖濃度応答性インシュリン放出システムに関して検討を行った。

まず、糖応答性インシュリン放出システムに関する検討に先立って、PBA基を有するポリマー・ビーズを作製し、このポリマーへの各種多価水酸基化合物の結合定数を比較した。本研究ではPBA基を側鎖に有するモノマーとして3-メタクリルアミドフェニルボロン酸を

合成し、逆相懸濁重合によってポリマーゲルビーズを作製した。

さらに前端クロマトグラフィー^{72,73)}を用いてPBA基を有するポリマーへの各種多価水酸化化合物の結合定数を測定し、インシュリンに修飾すべき多価水酸化化合物の選択に関する検討を行った。

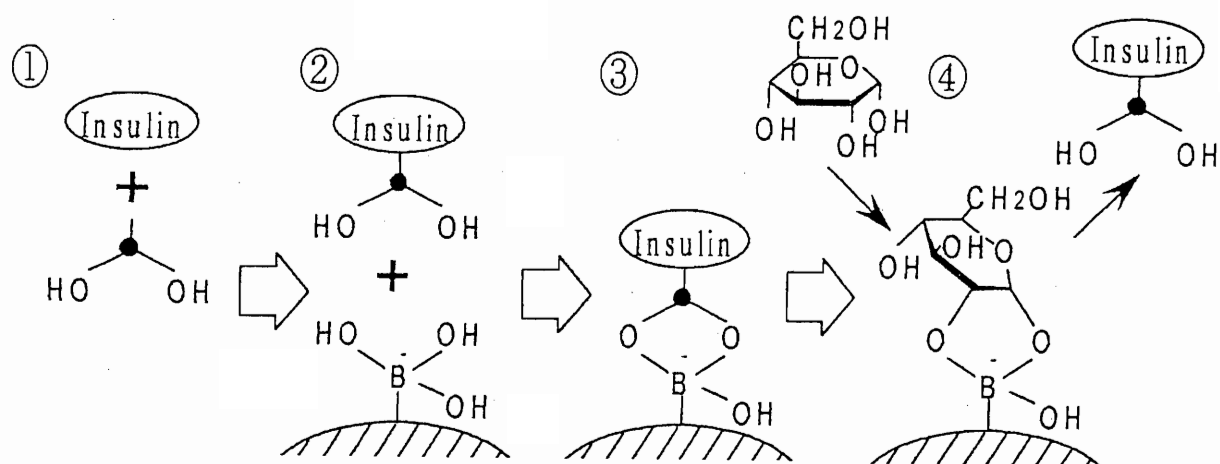


図 II - 2 多価水酸化化合物修飾インシュリンと PBA 基を有する材料を用いた糖濃度応答性インシュリン放出システムのメ

(PBA 基とコンプレックスを形成するグルコースの水酸基は特定されていないが、本論文では便宜上 α -D-グルコピラノシドの 1 及び 2 位がコンプレックスを形成する模式図で示す。)

II-2 : 実験方法

II-2-1 : 3-メタクリルアミドフェニルボロン酸(MAPB)の合成

図II-3に3-メタクリルアミドフェニルボロン酸の合成スキームを示す。

0.1 molの3-アミノフェニルボロン酸1/2硫酸塩(シグマ)、0.11 molのメタクリル酸(和光純薬工業)、0.11 molの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(Peptide Institute, Inc.)を300 mlの水に溶解し、氷浴にて冷却した。次に3N NaOHを用いてpH4.7に調整し、この溶液を1時間攪拌した。続いて、この溶液をジエチルエーテル(和光純薬工業)で抽出し、ジエチルエーテル相を減圧乾燥した。次に、この乾燥物を熱水に溶解、再結晶後、濾過、真空乾燥を行い、白色針状晶を得た(収率50%)。得られた化合物の¹H-NMR、およびUVスペクトル測定を行った結果、この化合物が3-メタクリルアミドフェニルボロン酸(MAPB)であることを確認した。

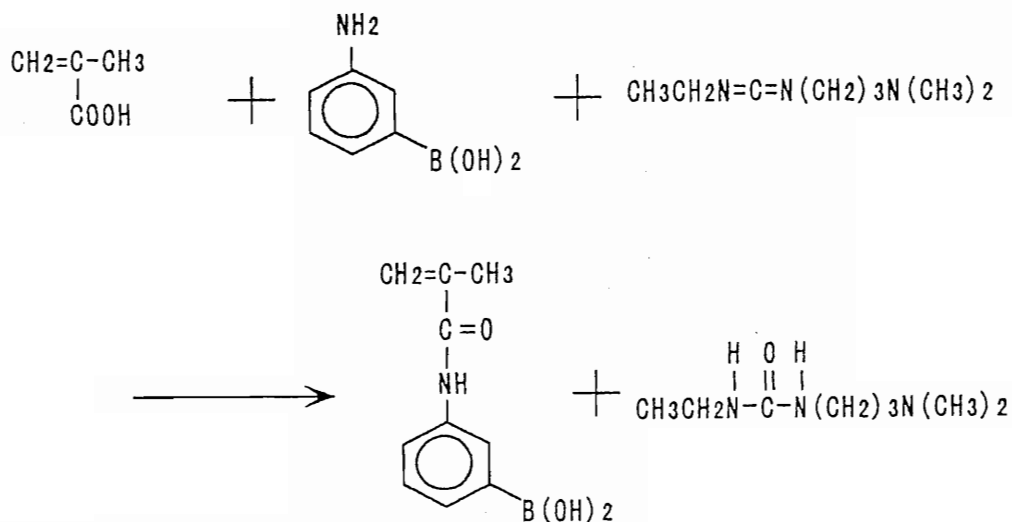


図 II - 3 MAPB の合成スキーム

$^1\text{H-NMR(DMSO-d}_6\text{)}$: δ 1.9(s; CH_3), 5.5, 5.8(s; CH_2), 7.3(t; phenyl), 7.5(d; phenyl), 7.7(d; phenyl), 7.9(s; phenyl), 8.0(s; B(OH)_2), 9.7(s; NH); $J_{\text{phenyl}}=7.7$ Hz. Intensity ratio: 3:2:1:1:1:1:2:1
 $\lambda_{\text{max}}=253.5$ nm ($\epsilon=8,500$ l/mol/cm)

II-2-2 : poly(MAPB-co-AAm-co-Bis(AAm))(BP)のポリマーゲルビーズの作製

PBA基を側鎖に有するポリマー・ビーズを作製するために、MAPBを用いて逆相懸濁重合を行った。図II-4に作製したコポリマーの構造式を示す。

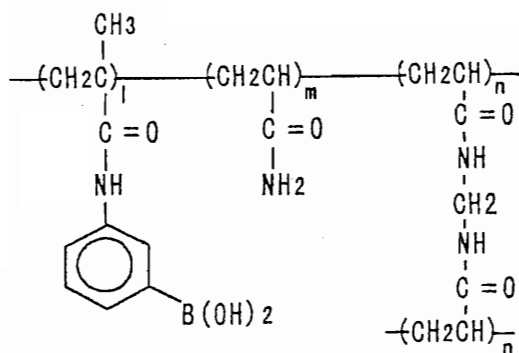


図 II - 4 poly(MAPB-co-AAm-co-Bis(AAm))の構造

960 mlのトルエン:クロロホルム=37:11(vol/vol)に、界面活性剤として4.8 mlのソルビタンセスキオリエート(Nacalai Tesque)を加え、窒素雰囲気下、2時間以上攪拌し、窒素置換有機相を調製した。 7.8×10^{-3} molのMAPB、 1.6×10^{-1} molのアクリルアミド(AAm; 和光純薬工業)、 9.4×10^{-3} molのN,N'-メチレンビス(アクリルアミド) (Bis(AAm); 和光純薬工業)をMILLI-Q (Milli pore)で精製した144 mlの水に溶解し、0.8 mlのアンモニウムパーオキシジスルフェート(和光純薬工業)水溶液(0.6 g/ml)を加えた。この水溶液をあらかじめ作製した有機相に滴下し、72°Cで1時間攪拌して重合を行った。次に、界面活性剤および未反応物を除去するために、られたビーズをトルエン(和光純薬工業)、エタノール(和光純薬工業)、蒸留水で順次洗浄した。次にこのビーズを凍結乾燥した結果、15.0 gの重合物(poly(MAPB-co-AAm-co-Bis(AAm)); BP)が得られ、重合収率がほぼ100%であることが確認された。また、乾燥ビーズのボロン含量を算出するために、プラズマ発光分析(依頼測定; 茨城環境技術センター)を行った^{74,75)}。

II-2-3: BPのpH滴定

0.5 gのBP(ボロン含量: 2×10^{-4} mol)に70 mlの脱気した蒸留水を加えてBPを膨潤させ、5 mlの0.1NHClおよび0.362 gのガラクトース(2×10^{-3} mol)(和光純薬工業)を加えた。次に、このサスペンションに0.1NNaOHを15分毎に加え、溶液のpH変化をpHメーター(Beckman ϕ 50)で測定し、BPの滴定を行った。

II-2-4: BPへの各種多価水酸基化合物の結合定数の測定

BPへの各種多価水酸基化合物の結合定数を前端クロマトグラフィー法を用いて評価した^{72,73)}。PBA基と多価水酸基化合物のコンプレックス形成は塩を添加した系で安定化することが広く知られていることから⁷⁶⁾、ここでは、緩衝液に塩化マグネシウムを添加して使用した。まず、0.15 gの凍結乾燥したBPを10 mmol/lの塩化マグネシウムを含むpH8.5の50 mmol/lの4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニウムエタンスルホン酸(HEPES)緩衝液に入れて膨潤させ、脱気後、1NNaOHを加えてpH8.5に調製した。次にこの膨潤ビーズを液体クロマトグラフィー用カラム(1 cm ϕ \times 3.15 cm; ファルマシア)に充填し、HEPES緩衝液を液体クロマトグラフィー用ポンプ(801SC, 880PU \times 2台; 日本分光)を用いて0.4 ml/min.の流速で送液した。流速を一定に保った状態で移動相を5 g/lのジオキサン(和光純薬工業)を含むHEPES緩衝液に交換し、この時の示差屈折強度の変化を示差屈折計(830-RI; 日本分光)を用いて測定した。使用した液体クロマトグラフィーシステムのポイドボリューム(V_0)は移動相を交換してから示差屈折強度が変化するまでに要した時間と流速より算出した。同

様に、HEPES緩衝液を0.4 ml/minの流速で送液し、流速を一定に保った状態で移動相を各種濃度([A]₀=2.0, 1.0, 0.5, 0.32, 0.2, 0.1 g/l)の図II-5に示した各種多価水酸基化合物((±)-3-アミノ-1,2-プロパンジオール(APD; アルドリッチ)、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール(AMPD; 和光純薬工業)、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(THAM; 和光純薬工業)、D-グルコース(Glu; 和光純薬工業)、D-グルクロンアミド(GAm; 東京化成工業)、α-メチルグルコピラノシド(M-GP; フナコシ)、p-ニトロフェニル α-D-グルコピラノシド(N-GP; シグマ)、グルコン酸カリウム(GA; 和光純薬工業)、ソルビトール(Sor; 和光純薬工業)、1-アミノ-1-デオキシソルビトール(ADSor; Fluka)を含有するpH8.5のHEPES緩衝液に交換した。このときの示差屈折強度が変化するまでに要した時間を測定することによって、各濃度、化合物に固有の溶出体積(V)を算出した。

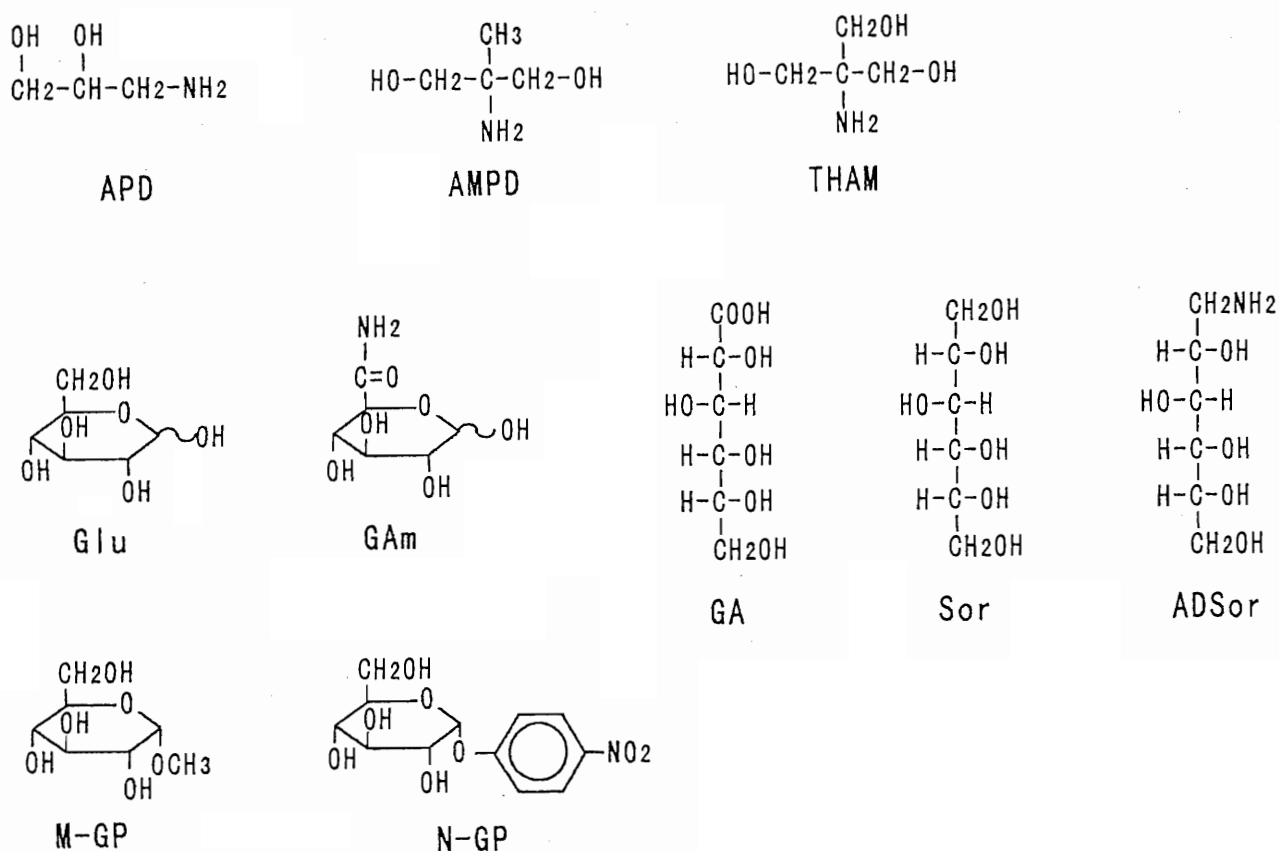


図 II - 5 各種多価水酸基化合物の構造

図II-6にBPビーズを充填したクロマトグラフィーカラムに各種濃度の多価水酸基化合物を送液した時の典型的な溶出曲線を示す。

前端クロマトグラフィー法ではV₀、[A]₀、V、結合定数(K_a)、結合可能なリガンド(PB基)の総数(Bt)は式II-1で表される^{72,73}。この式は Lineweaver-Burk 式類似の double reciprocal form (式II-2)に書き代えることができる。

ここで、測定から得られる値を用いて、 $1/([A]_0(V-V_0))$ に対して $1/[A]_0$ をプロットし、縦軸切片から K_a を求めた。

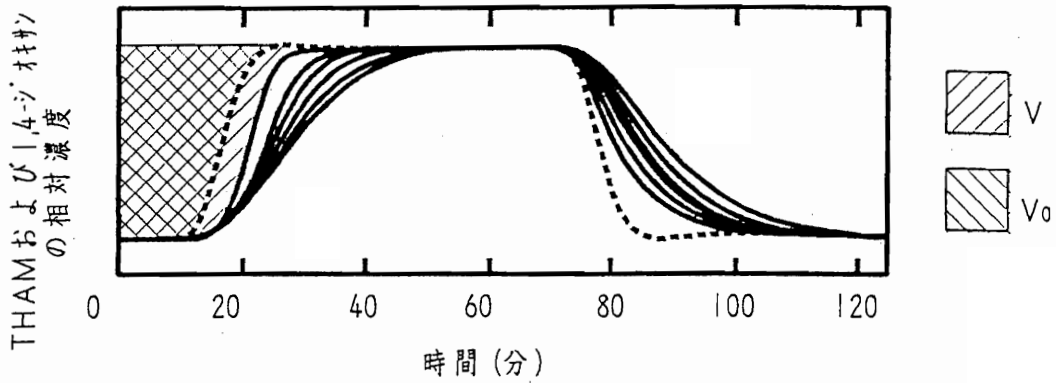


図 II - 6 前端クロマトグラフィーより得られた溶出曲線

—— THAM; 2.0, 1.0, 0.5, 0.32, 0.2, 0.1 g/l
 ジメチルアミン; 5.0 g/l

$$\frac{1}{K_a} = \frac{B_s}{V - V_0} - [A]_0 \quad (\text{式 II - 1})$$

$$\frac{1}{[A]_0 (V - V_0)} = \frac{1}{K_a \times B_s} \times \frac{1}{A_0} + \frac{1}{B_s} \quad (\text{式 II - 2})$$

II-3: 結果と考察

II-3-1: BPの特性評価

作製したBPの乾燥重量と使用したモノマーの総重量の比較から、重合はほぼ定量的に行われたことが確認された。また、重合直後(凍結乾燥前)のBPの顕微鏡観察から、このポリマーは $100 \mu\text{m} \sim 400 \mu\text{m}$ の直径のビーズであることが確認された。BPのMAPB組成比は、プラズマ発光分析より求められたボロン元素含量： $4.1 \times 10^{-4} \text{ mol/g}$ から算出され、4.4 mol%であることが判明した。図II-7にBPのpH滴定曲線を示す。

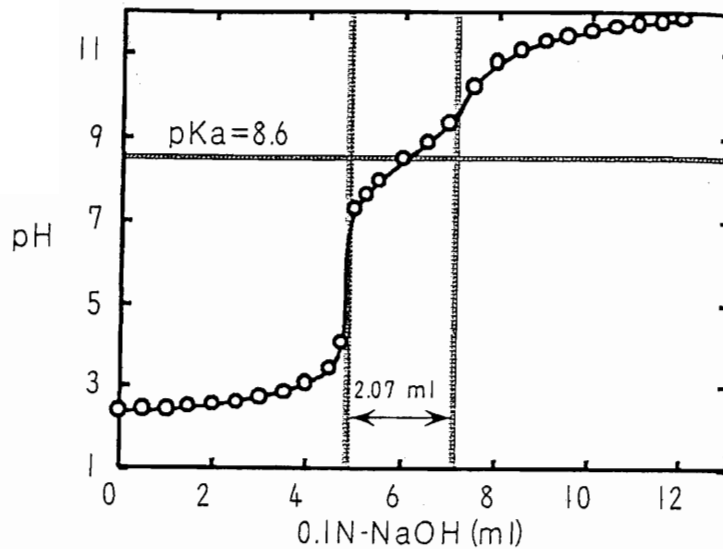


図 II - 7 poly(MAPB-co-AAm-co-Bis(AAm))
の滴定曲線

PBA基は2つの配位数をとりうるということが知られている^{50,58}。1つは3配位(-B(OH)₂)で、もう一つは4配位(-B(OH)₃)である。図II-7の0.1N NaOH水溶液量が0~5 mlの部分では、実験に先立って加えたHClに由来するpH2付近を示した。0.1N NaOHの量が5~8 mlでは3配位のPBA(-B(OH)₂)が4配位のPBA(-B(OH)₃)に転移する過程であり、pHは7.5~9.5で推移した。図II-7で横方向に網掛けした部分のpHはPBA基の4配位と3配位間の配位数変化に由来するpKa8.6であり、この値はこれまでに報告されているPBA基を有する化合物のpKa(3-プロピオンアミドフェニルボロン酸ではpKa8.6⁷⁷)と一致する。0.1N NaOHの量が8 ml以上では系内の滴定は終了し、過剰に加えたNaOHに由来する高いpHが観察された。ここで滴定に要したNaOHの量(2.07 ml/0.5 g・polymer: 図II-7で縦軸方向に網掛けした2本の線の間に対応している)は系内のPBA基の量に対応しており、 4.1×10^{-4} mol/g・polymerである。この値はプラズマ発光分析より得られたボロン量と一致している。このことは系内の総てのPBA基が配位数(3配位(-B(OH)₂)と4配位(-B(OH)₃))の変化を起こしたことを示している。PBAの配位数変化に由来すると考えられるpKaが存在し、滴定量が系内のボロン量と一致したことは、重合したBPのすべてのPBA基が重合後も他の水酸化化合物とコンプレックスを形成する能力を有していることを示唆している。

しかしながら、本測定がPBA基とOH⁻の反応であるのに対して、BPを用いた糖応答性インシュリン放出システムではPBA基と修飾インシュリンの反応であり、次章で用いる修飾インシュリン(G-Ins)の分子量が6089と大きいことを考慮すると、ポリマーゲルの網目の密度が、PBA基とG-Insのコンプレックス形成に影響を与えると考えられる。ポリマーゲル

の膨潤度は重合時の含水率や架橋剤の含率で調整でき、使用するpH等で若干変化する。BPの重合時の含水率(H_2O 重量/Monomers重量)は10である。ここで、MAPBを組成に含まない以外は同じ組成(AAm、Bis(AAm))からなるpoly(AAm-co-Bis(AAm))はSDSポリアクリルアミド電気泳動に広く用いられており、SDSポリアクリルアミド電気泳動用poly(AAm-co-Bis(AAm))ハイドロゲルの含水率は通常10-30であり、BPの含水率とほぼ同じである。また、BPの架橋剤含率も電気泳動用poly(AAm-co-Bis(AAm))ハイドロゲルの架橋剤含率とほぼ同じである。よってこれらのポリマーはほぼ同じ膨潤度であると考えることができる。SDSポリアクリルアミド電気泳動では種々分子量の異なるタンパクがpoly(AAm-co-Bis(AAm))ハイドロゲル中で自由に移動できることが知られている。これらのことから、タンパクとしては比較的小さな分子量であるG-InsはBP中で自由に移動することができ、BPポリマーゲルの網目の密度がG-InsのPBAへのコンプレックス形成を妨げることはないと考えられる。

さらに、BPは逆相懸濁重合で作製され、モノマー水溶液を有機相中に微粒子として分散させるために、開環糖に長鎖アルキル基をグラフトした構造のソルビタンセスキオリエートを界面活性剤として用いている。開環糖のOH基はPBA基とコンプレックス形成することが可能であることから、重合したビーズの表面はPBA基に富んだ構造をしており、G-InsがPBA基とコンプレックスを形成するのに適していると考えられる。

以上のことから、重合後のPBA基はかなりの確率でG-Insとコンプレックス形成が可能であると考えられる。

II-3-2: BPに対する種々多価水酸化化合物の結合定数の比較

PBA基が効率的に多価水酸化化合物とコンプレックス形成を行うことが可能なpH8.5で種々多価水酸化化合物のBPへの結合定数の測定を行い、多価水酸化化合物の分子構造に由来すると考えられる結合定数を比較検討した。表II-1に各種多価水酸化化合物のBPへの結合定数(K_a)を示す。

表 II - 1 各種多価水酸化化合物の PBA 基に対する結合定数

略号	$K_a(l/mol)$
APD	59
AMPD	83
THAM	190
Glu	630
GAm	420
M-GP	Not detectable
N-GP	Not detectable
GA	950
Sor	2200
ADSor	5100

APDとAMPDは、両化合物とも2つの水酸基を有しているにもかかわらず、AMPDのBPへの結合定数はAPDのBPへの結合定数より高かった。APDはPBA基とコンプレックスを形成する場合、5員環複合体を形成すると考えられるのに対して、AMPDはPBA基と6員環複合体を形成すると考えられる(図II-8)。AMPDのBPへの結合定数がAPDのBPへの結合定数より高いことは6員環複合体が、5員環複合体に比べて安定であることを示唆している。このことは通常の有機化合物が5員環より6員環の方が安定であるという一般的な知識と矛盾しない。

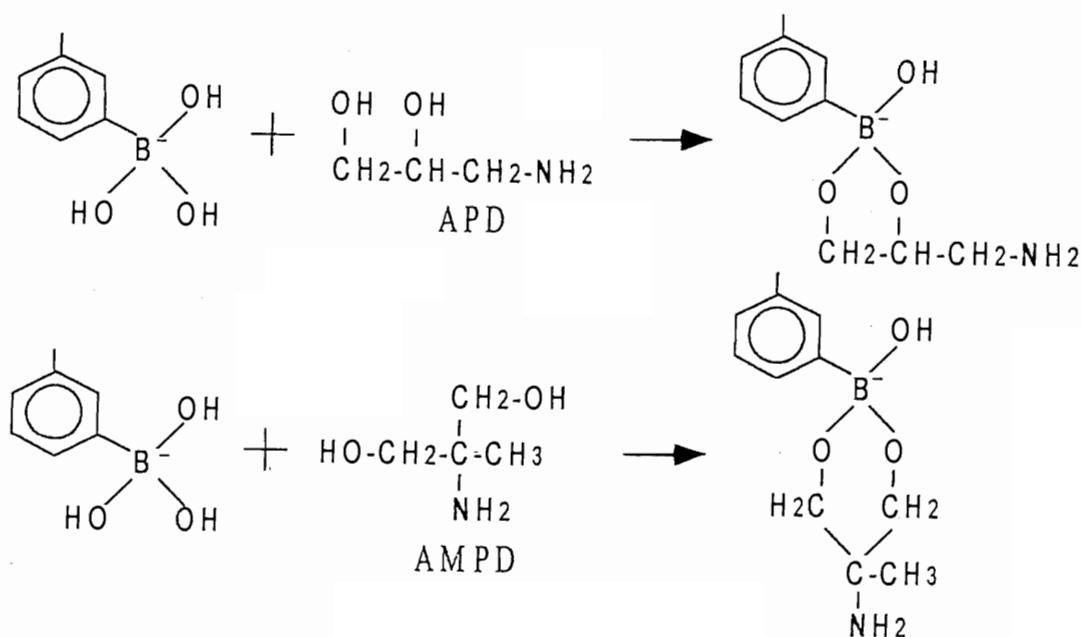


図 II - 8 PBA 基と APD または AMPD のコンプレックス形成

THAMのBPへの結合定数はAMPDのBPへの結合定数よりさらに高かった。これまでに、cis-イノシトール、およびトリエタノールアミンはPBA基と同時に3つのエーテル結合を介してコンプレックス形成することが報告されている⁵³⁾。AMPDは一分子中に2つの水酸基を有しており、THAMは3つの水酸基を有している。このことから、THAMのBPへの結合定数が相対的に高いのは、同時に3つのエーテル結合を介してコンプレックス形成している可能性と、水酸基の数が多いためにTHAMとPBA基とのコンプレックス形成の確率が高くなった可能性が考えられる。

GluのBPへの結合定数はTHAMのBPへの結合定数より高かった。Gluは1位の水酸基の方向の違いによって α 構造、 β 構造があり、それぞれに5員環構造、6員環構造がある。さらに、これら以外に開環構造が存在し、水溶液中では一定の存在確率で平衡状態にあることが知られている⁷⁸⁾。ここで、GluとPBA基が存在する条件では、より高い結合定数を有る構造のGluがPBA基とコンプレックスを形成する率が高くなるため、Gluの異性体の平衡は

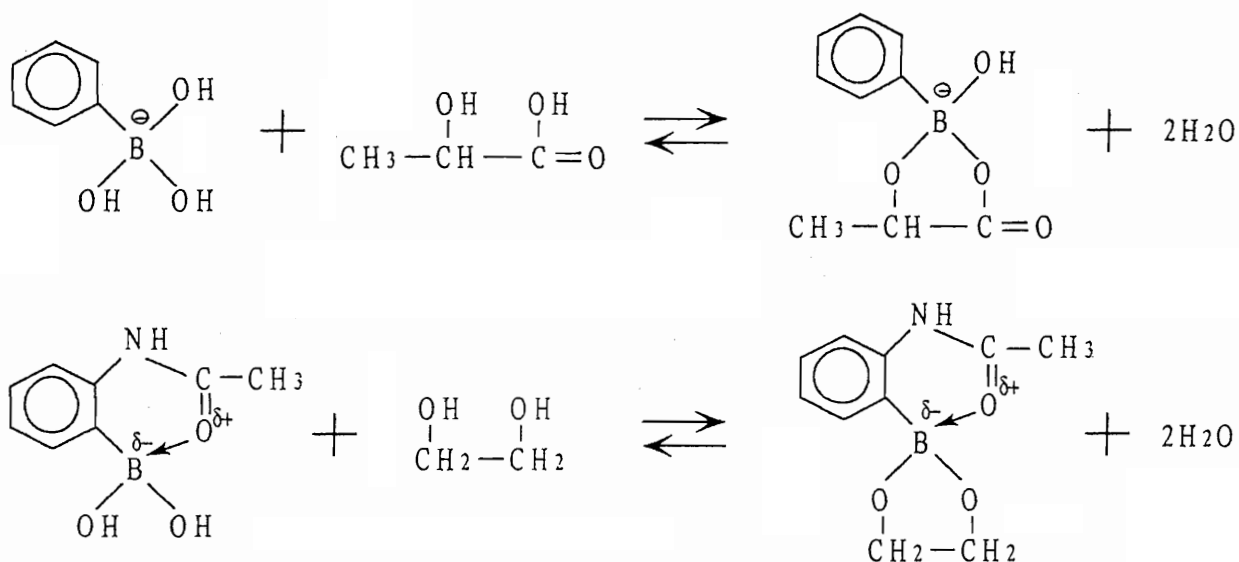
Glu単独の水溶液と比べて異なると考えられる。よって、GluのBPへの結合定数を測定しただけでは、コンプレックス形成したGluの各異性体の存在確率は特定できない。

GAmのBPへの結合定数はGluのBPへの結合定数に比べて若干低いがほぼ同様の値を示した。GAmとGluの構造を比較すると(図II-5)、GAmには6位の水酸基が存在しないことから、6位の水酸基はPBA基との結合において多大な影響を与えないことが確認された。

M-GPおよびN-GPは1位以外の水酸基がすべてGluと同じ配位をとっているにもかかわらず、BPに対する測定可能な結合定数が得られなかった。このことはGluとPBA基の結合は閉環糖の1、2位の水酸基がPBA基とコンプレックス形成していると考えられるほか、開環糖の複数の水酸基がPBA基とコンプレックス形成しているとも考えることもできる。M-GPやN-GPは1位にエステル結合があるため開環構造をとりえない。これに対してGluやGAmは1位の水酸基がフリーであるため、6員環構造のほかに5員環構造、さらには開環構造をとることができる。低分子ジオールとPBA基のコンプレックスは、通常6員環または5員環で構成され、コンプレックス形成時のジオールは立体構造の制約から、シス配置になることが知られている。また、低分子多価水酸化化合物とPBA基のコンプレックスは水酸基の数が多ほど結合定数が高くなる傾向があることが知られている。グルコピラノース(6員環)とグルコフラノース(5員環)と開環グルコースを比較すると、開環状態のグルコースは炭素-炭素間の結合が自由に回るため、シスジオールになり得る水酸基が4組存在する。これらのことから、GluとGAmの結合定数が高いのは、開環糖の複数の水酸基がPBA基とコンプレックス形成しているためと考えることができる。さらに、GluとGAmの結合定数が高いのは、開環糖のアルデヒドがPBA基と相互作用しているためと考えることができるが、これまでの報告では、カルボン酸とPBA基の相互作用は乳酸とPBA基を有するポリマーで知られており(図II-9上図)⁷⁹⁾、アミドの酸素原子とPBA基の相互作用は図II-9下図に示したフェニルボロン酸誘導体で知られている⁶⁷⁾が、アルデヒドとPBA基の相互作用は知られていない。

これらのことから、多価水酸化化合物がPBA基とコンプレックスを形成する上で高い結合定数を示すためには、一分子中の水酸基の数が多きこと、糖では開環構造が重要であることが示唆された。そこで次に3つの開環糖(GA, Sor, ADSor)のBPへの結合定数を比較検討した(表II-1)。その結果、これら3つの化合物はGluよりかなり高い結合定数を有することが判明した。これら3つの化合物は末端の官能基(アミノ基、水酸基、カルボキシル基)のみが異なることから、結合定数の違いはこれらの官能基に由来すると考えることができる。Wullfらはアミノ基がPBA基へ配位し、PBA基と水酸基間のコンプレックスを安定化させることを報告している⁸⁰⁾。本検討の3つの化合物の中ではアミノ基を有するADSorの結合定数が最も高いことから、アミノ基のPBA基への配位がPBA基と水酸基間のコンプレックスを安定化させたと考えられることができる。

以上、各種多価水酸基化合物のBPへの結合定数の比較検討より、開環糖類が高い結合定数を有し、さらに、側鎖の官能基によってその値が変化することが判明した。糖濃度応答性インシュリン放出システムに用いるインシュリンに修飾すべき多価水酸基化合物としては、PBA基を有するポリマーとのコンプレックス形成で高い結合定数を有し、さらにインシュリンの修飾に必要な官能基が必要なことから、GA、またはADSorが適当であることが判明した。



図Ⅱ-9 カルボキシル基またはアミド基とPBA基の相互作用^{97, 103)}

III. PBA基を側鎖に有するポリマーを用いたインシュリンの放出制御

III-1: 緒言

糖濃度変化に応じてインシュリンを放出するシステムの開発は、インシュリン分泌細胞であるランゲルハンス島 β 細胞が機能しなくなったインシュリン依存型糖尿病(IDDM)患者の治療に非常に有用である。これまでに、糖濃度変化に応じたインシュリンの放出(投与)を達成するために、インシュリン分泌細胞をカプセル化して患者に移植する方法¹³⁻¹⁶⁾、グルコースセンサーとコンピューターを組み合わせたインシュリン自動注入システム⁸⁾、等が生体に対して検討されてきた。さらに、材料自体が単独で糖濃度を検知、判断し、応答してインシュリンを放出する、いわゆる"自律応答材料"を用いたグルコース応答性インシュリン放出システムがいくつかのグループによって研究されてきた^{27,29,30)}。しかしながら、これらのインシュリン放出制御システムでは、生物由来のレクチン²⁷⁾やグルコースオキシダーゼ^{29,30)}等のグルコース応答性タンパクが使用されており、タンパクの変性によって、グルコース応答活性が低下し、インシュリンの放出に影響をおよぼすことが示唆された。本検討では、グルコースの濃度センサーとして生物由来の化合物ではなく、合成化合物の官能基であるPBA基を用いることによって、グルコース応答性タンパクを用いることなく、完全合成系のグルコース濃度応答性インシュリン放出システムを作製することを試み、その有用性を検証した。

本研究では、PBA基が多価水酸化化合物とコンプレックスを形成し、別の多価水酸化化合物と置換反応を起こすことに着目し、PBA基を有するポリマーの糖応答性インシュリン放出制御システムとしての応用に関して検討を行った。具体的には、まず、多価水酸化化合物修飾インシュリンのモデルとして、比較的簡便な調製法で作製でき、高い検出感度を有するトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン/フルオレセインイソチオシアネート複合体(THAM-FITC)を作製した。次に、PBA基を有するポリマーにTHAM-FITCを加えてコンプレックス形成させ、このコンプレックスにグルコースを加えたときの、THAM-FITCとグルコースの置換反応によるTHAM-FITCの放出制御に関して検討を行った。

次に、グルコースの添加によるインシュリンの放出実験に先立って、多価水酸化化合物のインシュリンへの修飾を行った。これまでにいくつかのグループによって、様々なインシュリンの化学修飾が報告されている⁸¹⁻⁸⁴⁾。これらの中で多価水酸化化合物修飾インシュリンとしては、グルコースが修飾されたサクシニルアミドフェニル- α -グルコピラノシド/インシュリン複合体⁸¹⁾が挙げられる。しかしながら、サクシニルアミドフェニル- α -グルコピラノシド/インシュリン複合体の糖側鎖である4-ニトロフェニル- α -グルコピラノシド(N-GP)はPBA基を有するポリマーへの結合を示さなかったことから、側鎖にPBA基を

有するポリマーを用いたインシュリンの放出制御システムには適さないと考えられる。

前章で、各種多価水酸化化合物のBPへの結合定数は、多価水酸化化合物の構造によって著しく異なり、開環型の糖類が比較的高い結合定数を有することが示された。そこで、インシュリンへ修飾する化合物の選定にあたって、これらの結果とインシュリンへの修飾反応の容易さを考慮して、カルボキシル基を有する開環型の糖であるグルコン酸を選択した。これまでに、化学修飾インシュリンの生理活性は、修飾化合物種と、修飾部位、修飾数によって変化することが報告されている⁸¹⁻⁸⁴)。アセチル化インシュリンとアセトアセチル化インシュリンの場合、生理活性は修飾数に依存せずに天然のインシュリンと同様であることが知られている⁸²)。しかしながら、サクシニルアミドフェニル- α -グルコピラノシドインシュリンとパルミトイル化インシュリンの場合、生理活性は修飾数に依存して生理活性が減少するとともに、修飾部位にも依存することが知られている^{81,83})。本実験では化学修飾による生理活性の減少を軽減するために、インシュリン1分子中3つある修飾可能なアミノ基のうち、1ないし2つのアミノ基を4-メトキシベンジルオキシカルボニル基で保護し、残った1ないし2つのアミノ基をグルコン酸で修飾後、保護基をはずすという方法を用いた⁸³)。さらに、作製したグルコン酸修飾インシュリン(G-Ins)は修飾タンパクの精製によく用いられるイオン交換クロマトグラフィー法^{82,84})を用いて精製した。なお、修飾インシュリンの免疫原性については閉環型の糖をウシインシュリンに修飾した系で免疫原性がないことをS. W. Kimらが詳細に報告している⁸¹)。

次に、得られたG-Ins、およびBPを用いて、糖の添加による修飾インシュリンの放出制御に関して検討を行った。G-InsおよびBPからなるインシュリン放出ゲルを液体クロマトグラフィー用カラムに充填し、グルコース濃度を変化させたときに、放出されたインシュリンの自然蛍光を測定し、PBA基を有するポリマーのインシュリン放出制御システムとしての有用性を検証した。

III-2：実験方法

III-2-1：修飾インシュリンのモデル化合物(THAM-FITC)の作製

図III-1にTHAM-FITCの合成スキームを示す。

まず、 2.56×10^{-3} molのフルオレセインイソチオシアネート isomer I (FITC; 和光純薬工業)を350 mlのN,N-ジメチルホルムアミド(DMF; 和光純薬工業)に溶解し、 3.07×10^{-3} molのTHAMを加え、43.5°Cで1時間攪拌した。次に、この反応液の溶媒を減圧留去した。得られた黄色い固体に200 mlの水を加え、さらにpHが約6~8になるように1N NaOHを加えてこ

の固体を溶解した。次に1NHClを用いてpHを2~3にすることで反応物を沈殿させ、濾紙(5C、Advantec)を用いて吸引濾過後、減圧乾燥を行った(収率57%)。得られた粉体の¹H-NMR、マススペクトル、およびIRスペクトル測定を行った結果、この化合物がトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン/フルオレセインイソチオシアネート複合体(THAM-FITC)であることが確認された。

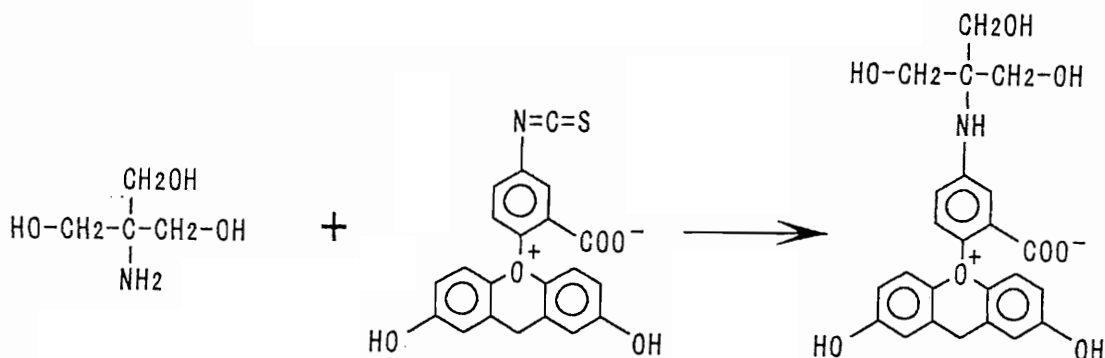


図 III - 1 THAM-FITC の作製

¹H-NMR(DMSO-d₆): δ 3.75(s; CH₂), 4.9(s; OH), 6.5-8.0(complexed; phenyl-H), 8.4(s, NH), 10.5(s, phenyl-OH), Intensity ratio: 6:3:9:1:2

MS (70 eV): m/e 511⁻ ([M+H]⁺).

IR (KBr, cm⁻¹): 2030 (N=C=S), 3350, 3300 (-NH₂)の消失

III-2-2 : グルコン酸修飾インシュリン(G-Ins)の作製と特性評価

図III-2にGAのインシュリンへの修飾反応スキームを示す。

まず、45 mlの炭酸緩衝液とDMFの混合溶媒(1NNaHCO₃: H₂O: DMF=2: 3: 4(体積比))に1.0 g(計算上のモル数: 1.74X10⁻⁴ mol)の牛インシュリン(シグマ)を加え、4.5時間放置して溶解した。次に、758 μmolのp-メトキシベンジルオキシカルボニルアジド(アルドリッチ)を加え、室温で2.5時間攪拌した。次に、この反応液に25 mlの50%酢酸水溶液を加え、減圧濃縮後、固形分を40 mlのジエチルエーテルで2回、40 mlの1%酢酸水溶液で1回リンスした。次に、20 mlの50%酢酸水溶液に溶解後、凍結乾燥を行い、0.9 gのp-メトキシベンジルオキシカルボニルアジド修飾インシュリン(MeOZ-Ins)を得た。

次に、40 mmolのGAを40 mlのジメチルスルホキシド(DMSO; 和光純薬工業)で希釈し、60 gのモレキュラーシーブ4A 1/8(和光純薬工業)を加えてこの溶液の脱水処理を行った。ここで、モレキュラーシーブは1日毎に交換し、この操作を3回繰り返した。次に、ろ過(5C; Advantec)によってモレキュラーシーブを除き、このろ液10 mlに対し、9 mmolのジシ

クロヘキシルカルボジイミド(和光純薬工業)を加え、さらに、5 mlのDMSOに溶解した10 mmolのN-ヒドロキシサクシンイミド(和光純薬工業)を加え、室温で1晩放置した。次に、この反応液の沈澱物(ジシクロヘキシルウレア)を濾過により除き、活性エステル化GA溶液を作製した。

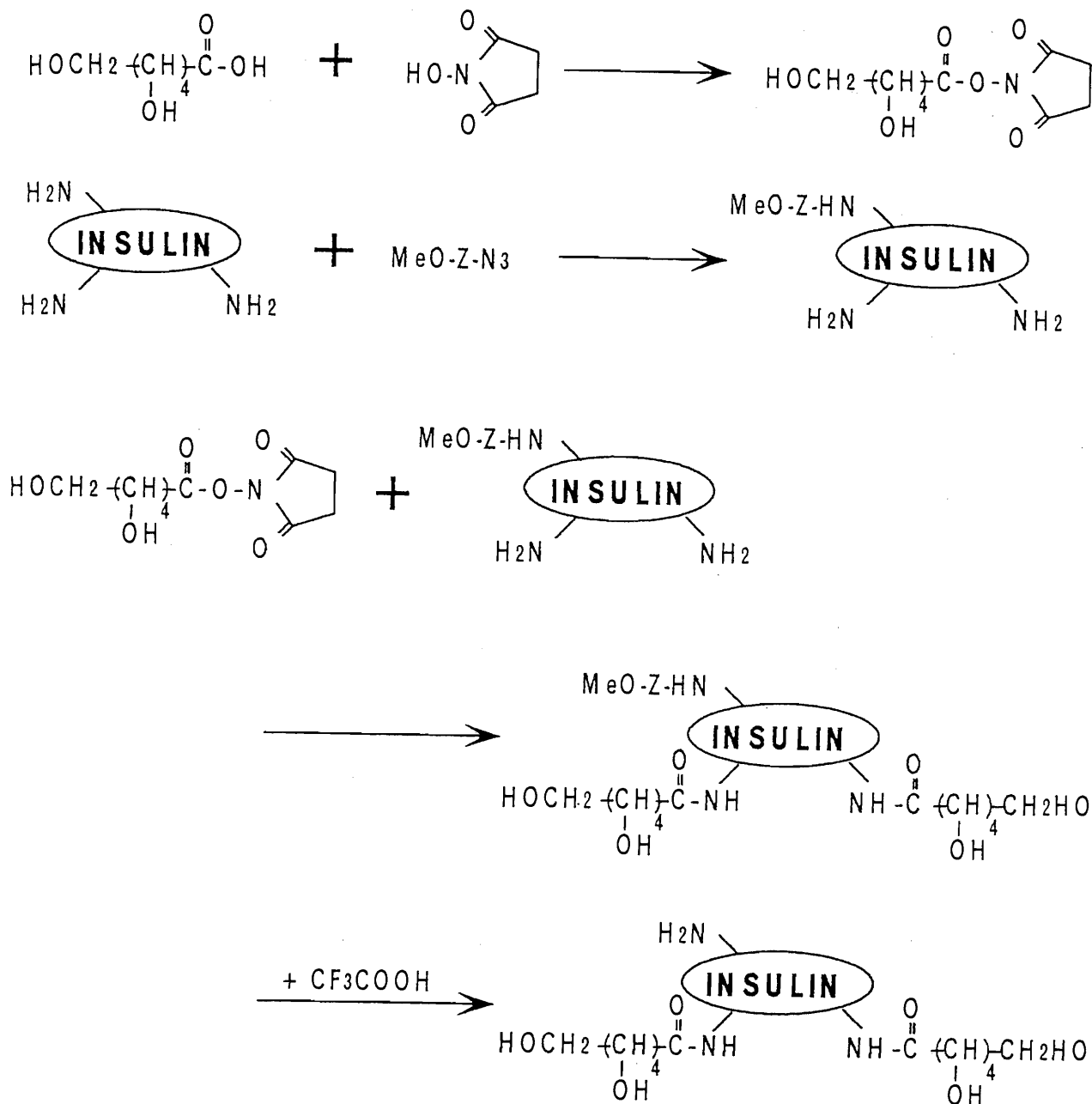


図 III - 2 G-Ins の作製

この活性エステル化GA溶液11.5 mlに0.8 gの前記MeOZ-Insを溶解した36 mlのDMF-炭酸緩衝液の混合液(1N NaHCO_3 : H_2O : DMF=2: 3: 4(体積比))を加え、室温で2時間攪拌後、減圧乾燥してGA修飾MeOZ-Insを得た。次に、100 mgのアニソール(和光純薬工業)を含む80 mlのトリフルオロ酢酸(和光純薬工業)を加え、氷冷下1時間放置して保護基であるMeOZ基(p-

メトキシベンジルオキシカルボニル基)をインシュリン分子より解離させた。次にこの溶液を30°Cで減圧濃縮し、水で透析後(Spectra/Por6 MWCO: 1,000)、凍結乾燥した。さらに、この乾燥物をクロロホルム、ジエチルエーテルを用いてリンスし、減圧乾燥することで種々置換数の異なるG-Ins混合物を得た。

次にイオン交換クロマトグラフィーを用いて、各置換度のG-Ins混合物の分離精製を行った。具体的には、0.2 gのG-Ins混合物を3 mlの7M-尿素(和光純薬工業)を含む10mM-THAM緩衝液(pH7.3)に溶解し、DEAE-セファデックスA-25(ファルマシア)を充填した1.5 cmφ×27 cmのカラム(ファルマシア)にインジェクションした。溶離液は7M-尿素を含む10 mM-THAM緩衝液(pH7.3)を流速0.9 ml/minで流し、プログラマブルポンプ(801SC, 880PU×2台; 日本分光)をコントロールして塩化ナトリウム濃度を図III-3に示した濃度変化で0~600 mMまで変化させた。ここでG-Insはチロシン残基由来の自然蛍光(Ex=275 nm, Em=304 nm)を蛍光検出器(820-FP; 日本分光)で検出し、溶出液は10分毎にフラクションコレクター(アドバンテック, SF-2120)で分取した。精製時のクロマトグラムを図III-3に示す。本検討ではメイン・ピーク分(図III-3のNo. 66-91のピーク)の溶出液を回収し、限外濾過(Model 8400, YM2-76 mm; Amicon)で濃縮した。さらに、5%の酢酸水溶液を移動相として用いてゲル濾過(セファデックスG-25(ファルマシア)、カラム: 2.1 cmφ×19 cm(ファルマシア))することで、尿素などの低分子不純物を除き、凍結乾燥を行った結果、99.2 mgの精製G-Insを得た。

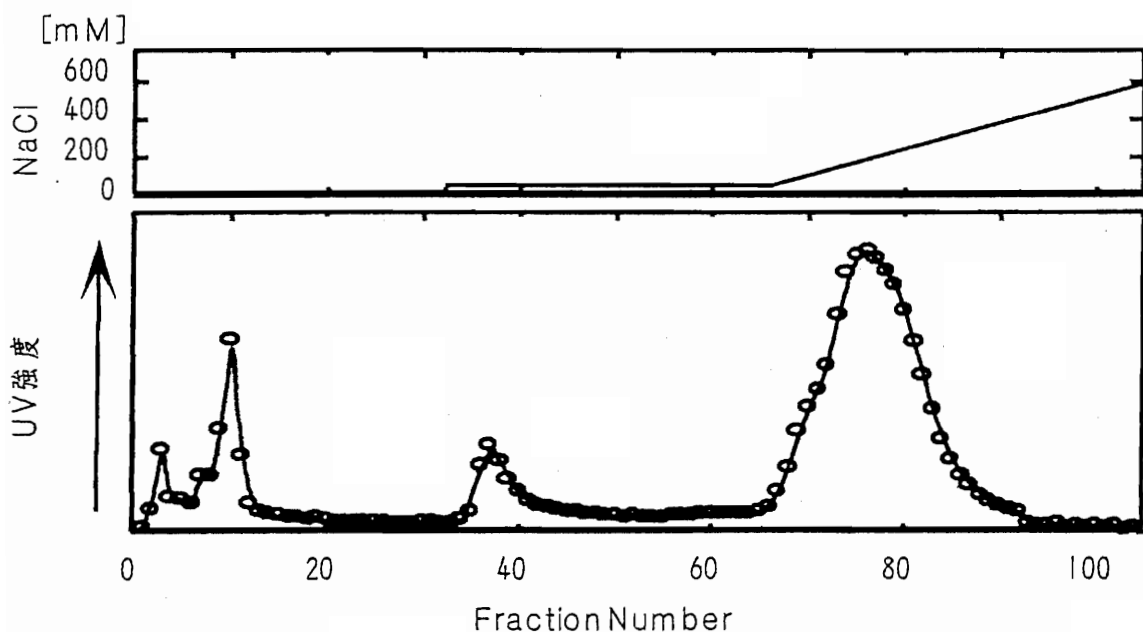


図 III - 3 イオン交換クロマトグラフィーによる G-Ins の精製

精製G-Insの遊離のアミノ基の定量は常法のニンヒドリン法⁸⁵⁾を用いて行い、等電点(pI)の測定はPhast System(ファルマシア)を用いて行った。等電点電気泳動では泳動後のG-Insが固定化されがたいことから、Phast Systemを使用するにあたって若干の変更を加えたので、その変更点を中心に等電点電気泳動測定法を以下に記す。まず、G-Insを最終濃度が500 $\mu\text{g/ml}$ になる様に少量の0.01N HClを加えて水に溶解し、この溶液4 μl を電気泳動装置のサンプル・インジェクターにセットした。電気泳動用ゲルとしてPhast Gel IEF 3-9(ファルマシア)を用い、800 Vh at 200 V, 2.5 mA, 3.5 W, 15°Cの条件で電気泳動を行った。次に、このゲルを20%のトリクロロ酢酸に浸漬し、25°Cで30分間放置してタンパクの固定を行い、10%エタノール水溶液を用いて50°Cで2回リンスを行った。さらに、5%グルタルアルデヒド水溶液に浸漬し、50°Cで6分間タンパクの固定を行った。タンパクの染色はPhast Gel Silver Kit(ファルマシア)(銀染色法)を通常の条件で用い、pIの数値化は市販のキャリブレーションキット(pI キャリブレーション・キット, ファルマシア)の泳動位置と比較、計算して行った。

III-2-3 : 糖添加によるBPからのTHAM-FITCの放出測定

糖濃度変化によるTHAM-FITCのBPからの放出は液体クロマトグラフィー装置を用いて検討した。図III-4に用いた液体クロマトグラフィー装置の構成図を示す。

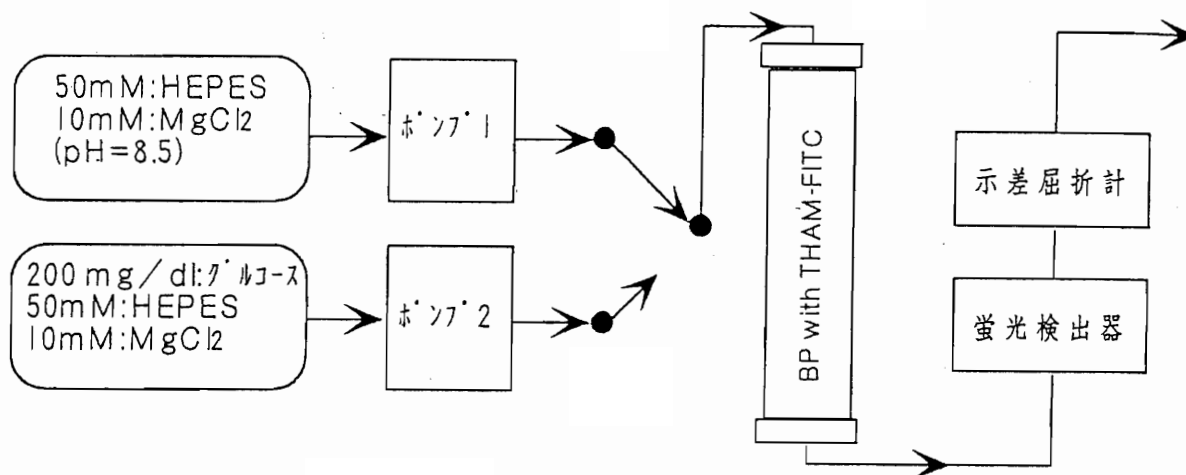


図 III - 4 糖濃度変化による THAM-FITC の放出に用いた実験装置の概念図

まず、8.5 mgの凍結乾燥したBP(PBA基含量が 3.5×10^{-6} mol)を0.6 mlのHEPES緩衝液(10 mmol/lの MgCl_2 を含有する50 mmol/lのHEPES緩衝液(pH8.5))に膨潤し、NaOHを用いてpH8.5に調整後、最終体積が1 mlになるようにさらにHEPES緩衝液を加えて膨潤BPを得た。次に 3.88×10^{-6} molのTHAM-FITCを前記HEPES緩衝液に最終体積が0.2 mlで、pH8.5になるようにNaOHを用いて溶解し、THAM-FITC溶液を得た。前記膨潤BPにこのTHAM-FITC溶

液を加え、室温で2日間放置後、このサスペンションを5 mmφ×10 mmの液体クロマトグラフィー用カラム(ファルマシア)に充填し、0.2 ml/minの条件で200分間HEPES緩衝液緩衝液を流し、コンディショニングを行った。次に、コンピューター・コントロール・ポンプ(802-SC, 880-PU: 2台; 日本分光)を用いて、50分間HEPES緩衝液を流し、さらに10分間200 mg/dlのグルコース(和光純薬工業)を含むHEPES緩衝液を流す操作を交互に繰り返した。このときの糖濃度変化を示差屈折計(830-RI; 日本分光)で、また、THAM-FITCの濃度変化を蛍光検出器(820-FP; 日本分光)(Ex=490 nm, Em=520 nm)で測定した。なお、本実験の条件では、グルコース濃度とTHAM-FITC濃度がこれらの検出器を用いることで、独立して検出可能であることを予備実験より確認した。

III-2-4: 糖添加によるBPからのG-Insの放出測定

BPからのG-Insの放出実験は前記” III-2-3” に準じて行った。条件の変更点がいくつかあるので詳細を以下に示す。

まず、15 mgの凍結乾燥したBP(PBA基含量: 4.95×10^{-6} mol)を0.7 mlのHEPES緩衝液(10 mmol/lのMgCl₂を含有する50 mmol/lのHEPES緩衝液(pH8.5))に膨潤した。次に、このサスペンションのpHをNaOHを用いて8.5に調整し、最終体積が1 mlになるようにさらにHEPES緩衝液を加え膨潤BPを得た。G-Ins溶液は40 mgのG-InsをHEPES緩衝液に最終体積が0.4 mlで、pH8.5になるようにNaOHを用いて溶解して得た。次に膨潤BPの上清をできるだけ除いた後に、 5.19×10^{-6} molのG-Ins溶液(316 μl)を加え、室温で1晩放置した。このサスペンションを5 mmφ×16 mmの液体クロマトグラフィー用カラム(ファルマシア)に充填し、0.2 ml/minの条件で200分間HEPES緩衝液を流すことによりコンディショニングを行った。続いて、コンピューター・コントロール・ポンプ(802-SC, 880-PU×2台; 日本分光)を用いて、50分間HEPES緩衝液を流し、10分間200 mg/dlのグルコース(和光純薬工業)を含むHEPES緩衝液を流す操作を交互に繰り返した。このときの糖濃度を示差屈折計(830-RI、日本分光)を用いて測定すると同時に、G-Ins濃度を蛍光検出器(820-FP、日本分光)を用いてインシュリンの自然蛍光(Ex=275 nm, Em=304 nm)から検出した。なお、本実験の濃度ではグルコース、およびG-Insがこれらの検出器によって独立して検出可能なことを予備実験より確認した。また、コンディショニング時に流出したG-Ins量および最初の放出ピークでのG-Ins放出量は、分取した流出液の275 nmの吸光度を測定して算出した。さらに、G-Ins放出量のグルコース濃度依存性の測定では、送液するグルコース濃度を0 mg/dlから50 mg/dl(20分間)、0 mg/dl(50分間)、100 mg/dl(20分間)、0 mg/dl(50分間)、150 mg/dl(20分間)、0 mg/dl(50分間)、200 mg/dl(20分間)、0 mg/dlと変化させ、これを繰り返し同様の検出を行った。なお、G-Insの放出量はコピー用紙にコピーしたクロマトグラムベースラインからのピーク重量と、あらかじめ作製したコピー用紙重量に対するG-Ins量の検量線から算出した。

III-3：結果と考察

III-3-1：G-Insの作製と特性評価

インシュリンは分子内に3つのアミノ基と6つのカルボキシル基を有し、等電点(pI)が5.7の⁸²⁾、通常はアニオン交換樹脂と相互作用を示さないタンパクである。一方、アミノ基を化学修飾したインシュリンの場合、アミノ基の数が化学修飾によって減少していることから、pIが減少し、インシュリンのカルボキシル基がアニオン交換樹脂とイオン相互作用をすると考えられる。したがって、インシュリンはアニオン交換樹脂を用いたイオン交換クロマトグラフィーでは比較的短時間で溶出するが、G-Insはアニオン交換樹脂とイオンの相互作用するためにはすぐには溶出せず、NaClの添加により溶出すると考えられる。事実、インシュリンを試料としてアニオン交換樹脂を用いたイオン交換クロマトグラフィーを行うと、図III-3(G-Insをサンプルとしたときのクロマトグラム)の初めのピークしか観察されない。一方、G-Ins混合物を用いると、NaClの添加によってさらに2つの溶出ピークが観察された(図III-3)。No. 66-91の溶出物はNo. 40付近の溶出物より塩濃度の高い条件で溶出していることから、GA修飾率が相対的に高いG-Insであると考えられる。このことはNo. 66-91のG-InsがNo.40付近のG-InsよりBPとコンプレックスを形成しやすい可能性を示している。また、No. 66-91のG-Insの溶出ピーク面積が最も広く、主生成物と考えられることから、メインピーク(No. 66-91)分のG-Ins溶出液を分取し、精製した。

精製したG-Insは、ニンヒドリン法によるフリーのアミノ基の定量より、未修飾のインシュリンに比べて33.2%のアミノ基しか存在ないことが判明した。このことはG-Insがインシュリンの3つのアミノ基のうち2つがGAで修飾されたG-Insであることを示している。さらに、等電点電気泳動による等電点測定の結果、未修飾のインシュリンのpIが5.7であるのに対して、G-InsのpIは4.5であることが判明した。この結果はLindsayらのインシュリンのアセチル化数の増加に伴いpIが減少するという報告⁸²⁾と一致する。さらに、G-Insの275 nmでの吸光係数はUV測定の結果 $\epsilon = 3790 \text{ l/mol/cm}$ (MW6089として計算)であることが確認された。

III-3-2：糖添加によるBPからのTHAM-FITCの放出特性評価

本項では、PBA基を有するポリマーの糖応答性インシュリン放出システムとしての評価を、修飾インシュリンを用いて行うのに先立って、修飾インシュリンのモデルとして、比較的簡便に作製可能で、高い検出感度を有するTHAM-FITCを作製し、PBA基を有するポリマーの糖応答性を検証した。

図III-5にグルコース濃度を変化させたときのTHAM-FITCの放出挙動を示す。この図よ

り、THAM-FITCは流したグルコース濃度変化に追従して遅れ時間なしに放出することが確認された。なお、グルコース濃度が0 mg/mlのときにTHAM-FITCの濃度が0 mol/lでないことは、PBA基とTHAM-FITCのコンプレックス形成が平衡反応であることを示している。

グルコース濃度変化に応答して多価水酸基修飾インシュリンのモデル化合物であるTHAM-FITCが放出されたことは、図II-2に示したメカニズムの糖濃度応答性インシュリン放出システムがPBA基を有する合成系の材料を用いることによって可能であることを示唆している。

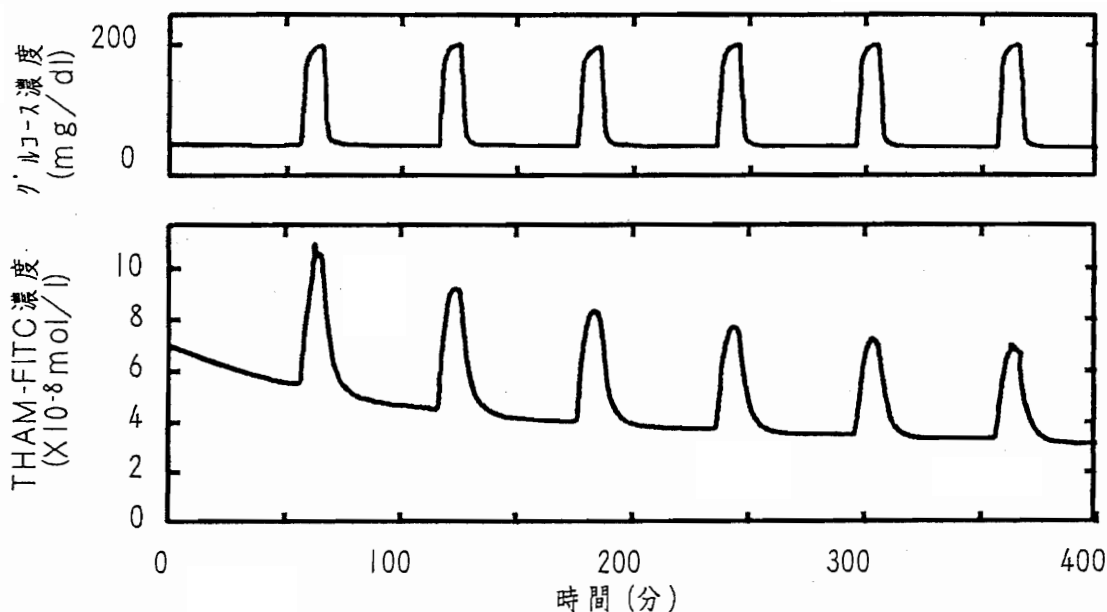


図 III - 5 poly(MAPB-co-AAm-co-Bis(AAm))からのグルコース濃度変化による THAM-FITC の放出

III-3-3: 糖添加によるBPからのG-Insの放出特性評価

図III-6にグルコース濃度を变化させた時のG-InsのBPからの放出挙動を示す。

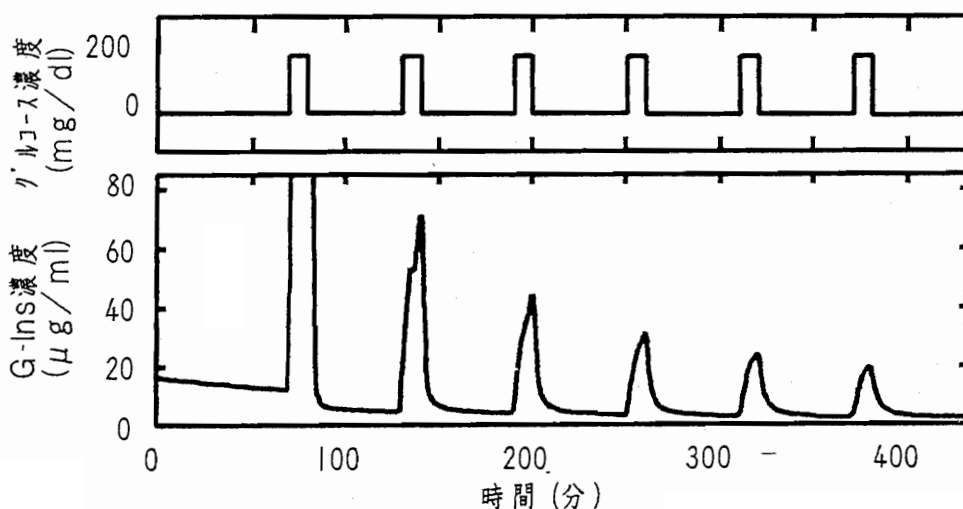


図 III - 6 グルコース濃度を 0 から 200 mg/dl に变化させた時の BP からの G-Ins の放出挙動

上図は送液したグルコース濃度の理論値を示し、下図に蛍光検出器で測定したG-Insの濃度を示す。図中0分は200分間のHEPES緩衝液の送液によるコンディショニングを終了した時点であり、この時点で、使用したG-Insの34%(10.7 mg)がBPを充填したカラム中にあることを、コンディショニング時に流出したG-InsのUV測定から確認した。図III-6の1番目のG-Ins放出ピークは2番目のものに比べて10倍あることが流出液のUV測定から確認された。このことはBPのビーズ表面にG-Insの吸着層が存在し、最初の糖添加の時のみ大量のG-Insが放出したことを示唆している。G-Insの放出濃度変化は、モデル化合物(THAM-FITC)を用いた時と同様、カラムに繰り返し流したパルス型のグルコース濃度変化にตอบสนองしてパルス型に変化した。

通常、健常人の血糖値は70~130 mg/dlであり、典型的な糖尿病患者では血糖値は180 mg/dlを超えることが知られている⁸⁶⁾。そこで、糖尿病患者の血糖値から健常人の血糖値をカバーした範囲でグルコース濃度を変化させた時のBPからのG-Insの放出に関して検討を行った。図III-7にグルコース濃度を80 mg/dlから200 mg/dlに変化させた時のG-Insの放出挙動を示す。

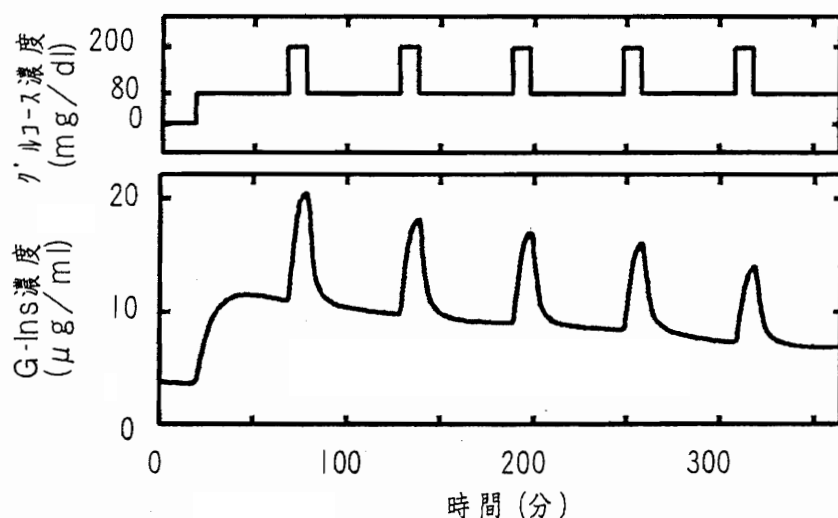


図 III - 7 グルコース濃度を 80 から 200 mg/dl に変化させた時の BP からの G-Ins の放出

図III-7に示した実験では、ビーズ表層由来と考えられる初回のグルコース送液時における大量のG-Ins流出を避けるために、250分間の緩衝液のコンディショニングに加えて、200 mg/dlのグルコースを加えた緩衝液で10分間、さらにグルコースを加えない緩衝液で50分間コンディショニングし、これを6回繰り返した後に実験を行った。図III-7には、グルコース濃度が0 mg/dlの時点からのデータを示しており、20分後でグルコース濃度を80 mg/dlに変化させた。このグルコース濃度の変化によってG-Insの放出のベースラインが4 μ g/mlから11 μ g/mlへと変化した。さらに、グルコース濃度を80 mg/dlから200 mg/dlへ変

化させるとG-Insの放出はグルコース濃度変化に追従して約2倍になった。このことから、より生体の血糖値変化に近いグルコース濃度変化(80 mg/dlから200 mg/dl)でも、G-Insの放出がコントロール可能であることが確認された。また、この実験におけるG-Insの平均放出量は $0.38 \text{ mg/cm}^3 \cdot \text{hr.}$ であることが確認された。この値は生体内に長期間埋め込むためのデバイスを考える上で十分な値である。

次にG-Ins放出量のグルコース濃度依存性に関して検討を行うために、送液するグルコース濃度を0 mg/dlから50 mg/dl、100 mg/dl、150 mg/dl、200 mg/dlと変化させたときのG-Insの放出に関して検討を行った。この結果を図III-8に示す。

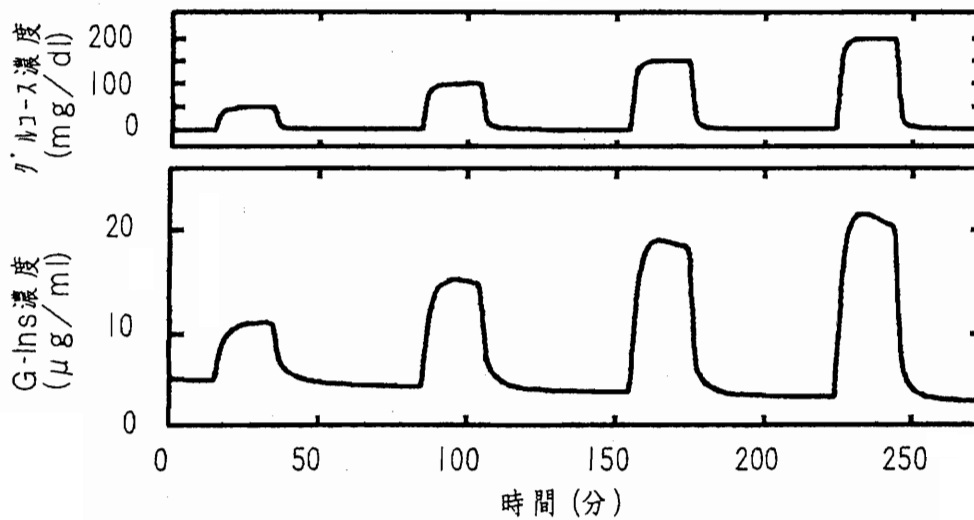


図 III - 8 グルコース濃度を変化させたときの BP からの G-Ins の放出

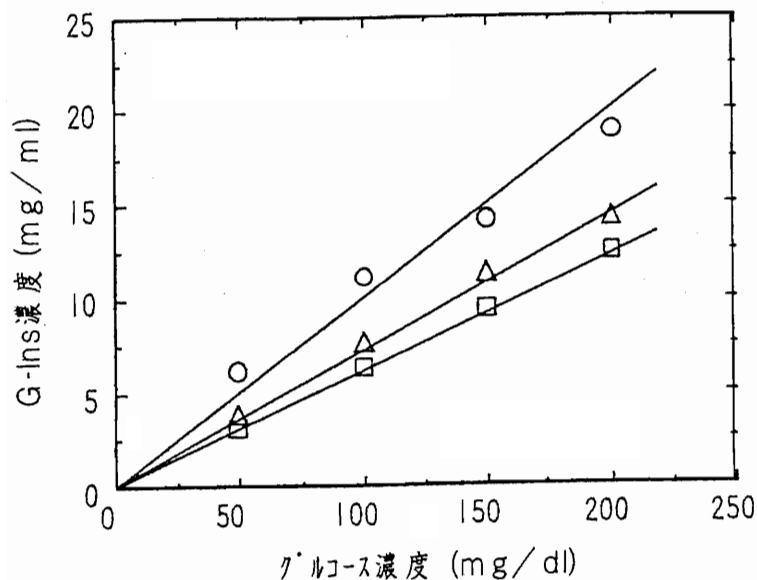


図 III - 9 流したグルコース濃度と放出した G-Ins 濃度の関係

○: 1回目、△: 2回目、□: 3回目

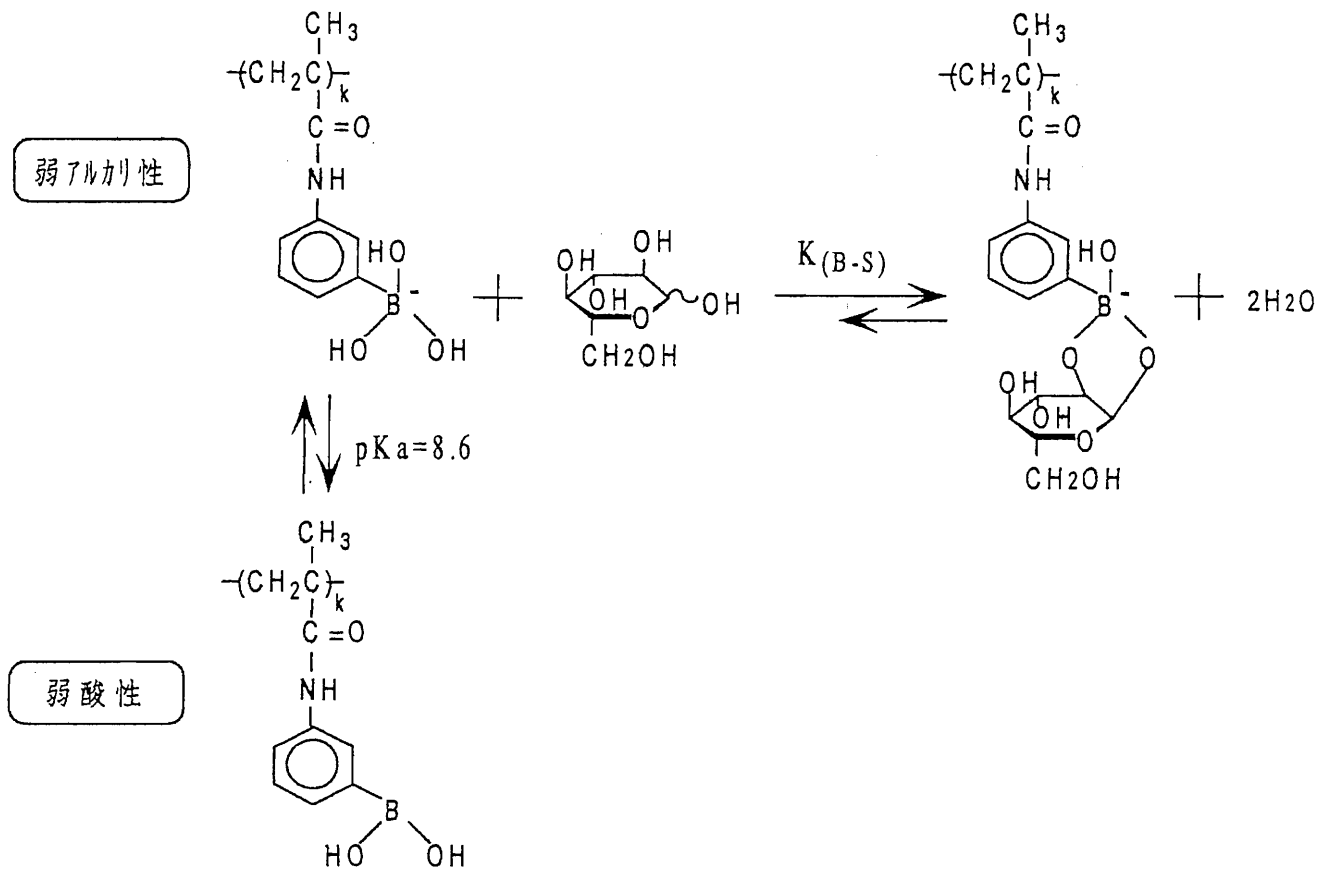
図III-8の上図は示差屈折計で測定したグルコース濃度の実測値を示し、下図は蛍光検出器で測定したG-Insの濃度を示した。本クロマトグラムより、流したグルコース濃度の増加に応じて遅れ時間なしにG-Ins放出量が増加していることが確認された。送液したグルコース濃度と放出G-Ins量の関係を明確にするために、図III-8下図のベースラインからのピーク面積から求めたG-Insの放出量をグルコース濃度に対してプロットした(図III-9)。本測定はG-Insの再充填なしに3回引き続いて行った。図III-9より、G-Insの放出量は実験サイクルにともなうカラム中のG-Insの減少にしたがって減少したが、グルコース濃度に対してほぼ直線関係があることが判明した。また、本システムのG-Ins放出は健常人の血糖値の範囲だけでなく、糖尿病患者の血糖値の範囲までもカバーしていることが示された。

以上の結果より、図II-2に示した糖と多価水酸化化合物修飾インシュリンのPBA基への競争吸着を利用したインシュリンの放出メカニズムが実現可能であることが示された。本検討のPBA基を有するポリマーを用いた糖濃度応答性インシュリン放出制御システムはグルコース応答性タンパクを用いない完全合成系の自律応答材料によってインシュリンの放出制御を成し遂げた最初の報告である。このメカニズムを基礎にして、さらなる材料の改良を加えることによって、ランゲルハンス島 β 細胞のインシュリン分泌により近い人工膵島が作製可能になるであろう。

IV. 生理的pHでのPBA基を有するポリマーへのグルコースのコンプレックス形成におけるアミノ基の影響

IV-1: 緒言

PBA基は弱酸性領域で3価構造(-B(OH)₂)を、弱アルカリ領域で4価構造(-B(OH)₃)を取る事が知られており、4価構造をとったPBA基のみが水溶液中で多価水酸化化合物と安定なコンプレックスを形成することが可能である(図IV-1)^{50,58}。



図IV-1 PBA基の構造変化とグルコースとのコンプレックス形成

ここで、3価構造と4価構造の平衡はpKaによって規定され、解離度 α (-B(OH)₂と-B(OH)₃の比率)とpKa、pHの関係は式IV-1で表される。

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{(pKa - pH)}} \quad \text{(式IV-1)}$$

ここで、生理的pH7.4における α は、PBA基を側鎖に有するポリマーのモデル化合物であるプロピオンアミドフェニルボロン酸の $pK_a8.6$ ⁷⁷⁾を式IV-1に代入することで $\alpha=0.06$ と算出され、生理的pHで6%のPBA基しか4価構造をとっていないことが判明した。このことから、本モデル化合物のPBA基は生理的pH7.4で効率的な多価水酸化化合物とのコンプレックス形成が望めないことが示唆され、インシュリンの放出制御システムに応用した場合、生理的pHで十分機能しない可能性が示唆された。

アミノ基はPBA基と多価水酸化化合物のコンプレックス形成を安定化する作用があることが報告されている^{80,87)}。具体的には、ボレートと多価水酸化化合物間のコンプレックスがメタノール溶液中でアミノ基の存在によって安定化すること⁸⁰⁾や、アミノ基と水酸基を有する化合物が生理的pHの水溶液中でPBA基を有する化合物と安定なコンプレックスを形成すること⁸⁷⁾が報告されている。また、我々のグループは側鎖にアミノ基とPBA基を有する直鎖状ポリマーを作製し、このポリマーの60%以上のPBA基が生理的pHで4価構造をとっていることを報告した⁸⁸⁾。しかしながら、PBA基と多価水酸化化合物のコンプレックス形成におよぼすアミノ基の影響を詳細に研究した報告は知られていない。

本章ではアミノ基とPBA基を有する架橋共重合ハイドロゲルビーズを作製し、PBA基とグルコースのコンプレックス形成量のアミノ基含量依存性を生理的pH7.4で検討した。[アミノ基]/[PBA基]比率を簡便に変化させることができる各種組成のpoly(MAPB-co-DMAPAA-co-AAm-co-Bis(AAm))(BAP)を作製し、各種条件でグルコースの結合量を詳細に比較、考察し、生理的pH7.4での本ポリマーの有用性を検討した。

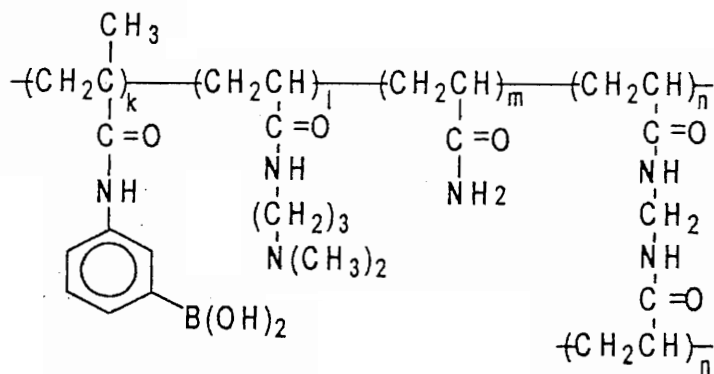
IV-2: 実験方法

IV-2-1: 各種poly(MAPB-co-DMAPAA-co-AAm-co-Ais(AAm))(BAP)ポリマー・ビーズの作製

表IV-1に示したモノマー仕込組成で逆相懸濁重合を行うことによりPBA基とアミノ基を有するポリマーゲルビーズを作製した。その構造式を図IV-2に示す。

表IV-1 poly(MAPB-co-DMAPAA-co-AAm-co-Bis(AAm))の調製と評価

Run No.	Mol. in feed ($\times 10^{-3}$ mol)				Mol. in copolymer ($\times 10^{-4}$ mol/g)		[アミノ基] /[PBA基] in copolymer
	MAPB	DMAPAA	AAm	Bis(AAm)	Boron	Amine	
BAP-6.7	7.8	33.1	141	28.1	1.8	12.1	6.7
BAP-2.4	7.8	15.6	202	18.0	2.2	5.4	2.4
BAP-0.9	7.8	7.8	227	14.0	2.5	2.1	0.85
BP	7.8	-	160	9.4	3.3	-	0



図IV-2 BAPの構造式

具体的には、蒸留したトルエン(和光純薬工業)と蒸留した1,1,2,2-テトラクロロエタン(和光純薬工業)を37:11の体積比で混合し、この混合溶媒960 mlに4.8 mlのソルビタンセスキオリエート(ナカライ・テスク)を加え、窒素雰囲気下2時間攪拌し、有機相を得た。次に、再結晶化したMAPB、蒸留したN,N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド(DMAPAA; 興人)、AAm、Bis(AAm)を表IV-1に示したモノマー仕込組成で、140 mlの精製水(MILLI-Q (Millipore))に溶解し、 1.47×10^{-3} molの2,2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)2塩酸塩を加え、モノ

マー溶液(水相)とした。ここで、重合時のアミノ基のボロン原子への配位を期待して、このモノマー溶液に1 mol/lのHClを加えてpH8.4にした。次にこのモノマー溶液を前述の有機相へ約5 ml/minの滴下速度で滴下し、60 °C、7時間、120 rpmの攪拌速度で懸濁重合を行うことによってBAP(poly(MAPB-co-DMAPAA-co-AAm-co-Bis(AAm)))ポリマー・ビーズを得た。次に、このポリマー・ビーズをトルエン(和光純薬工業)、エタノール(和光純薬工業)、蒸留水で洗浄後、凍結乾燥を行った。ここで、BP(poly(MAPB-co-AAm-co-Bis(AAm)))は、DMAPAAを用いない以外BAPと同様の方法で作製した。得られたポリマーのPBA基含量はプラズマ発光分析法^{74,75)}を用いて定量し、アミノ基含量はプラズマ発光分析の結果と、次に示す電導度滴定の結果より算出した。

IV-2-2 : BAPの電導度滴定

まず、300 mgの各種乾燥BAPを乳鉢で粉碎し、200 mlの精製水(MILLI Q (Milli pore))を加えることでBAPを膨潤させた。次に、アミノ基含量率に応じて2~9 mlの0.1 mol/l NaOH水溶液(和光純薬工業)を加えた後に、減圧脱気を行った。次からの操作は、空気中の二酸化炭素の溶解によるpHの変動を防ぐために、すべての操作を窒素ボックス内で行った。まず、脱気した試料懸濁液中に100メッシュのナイロンメッシュで覆った電導度測定用の電極を設置した。次に、この試料液に0.1 mol/l HCl(和光純薬工業)を0.4 mlづつ滴下後、15分から30分間攪拌し、電導度計(DS.8F; ホリバ)を用いて電導度の測定を行い、この操作を繰り返した。

IV-2-3 : 生理的pHでのグルコースのBAPへの結合量の測定

まず、 2.5×10^{-5} molのボロン元素を含む各種乾燥BAP、およびBPに、種々pH(pH6.2, 7.4, 10.0)、種々NaCl濃度(NaCl; 0.1, 1.0 mol/l)の100 mmol/lリン酸緩衝液を加え、細菌増殖を阻害するためのUV照射(殺菌灯GL-15; ナショナル)を行いながら、37°Cで24時間膨潤させた。次に、これらのサスペンション中に発生する気泡を振動して取り除き、同上の緩衝液を用いてBAP、およびBPをリンスした。なお、リンス後のサスペンションのpHは各々6.2, 7.4, 10.0を示していることから、リンスが十分であることが確認された。次に、サスペンションの上清を可能な限り除き、 2.3×10^{-6} molのD-グルコース(和光純薬工業)(36.2 mg/ml, 100 μ l)を加え、その最終体積が1.81 mlになるように同上の緩衝液を加えた。これらのサスペンションを37°Cで24時間振盪し、上清のグルコース濃度をグルコース測定キット(グルコースCII-Test Wako; 和光純薬工業)(ムタロターゼ/ β -D-グルコースオキシダーゼ/ペーオキシダーゼ法 1 1 8) による)を用いて測定した。なお、BAP、BPに結合したグルコース量は使用したグルコース量(2.3×10^{-6} mol)と上清のグルコース量の差より算出した。測定は各3回行い、図にはその平均と標準偏差を示した。なお、本グルコース測定法では前記各種緩

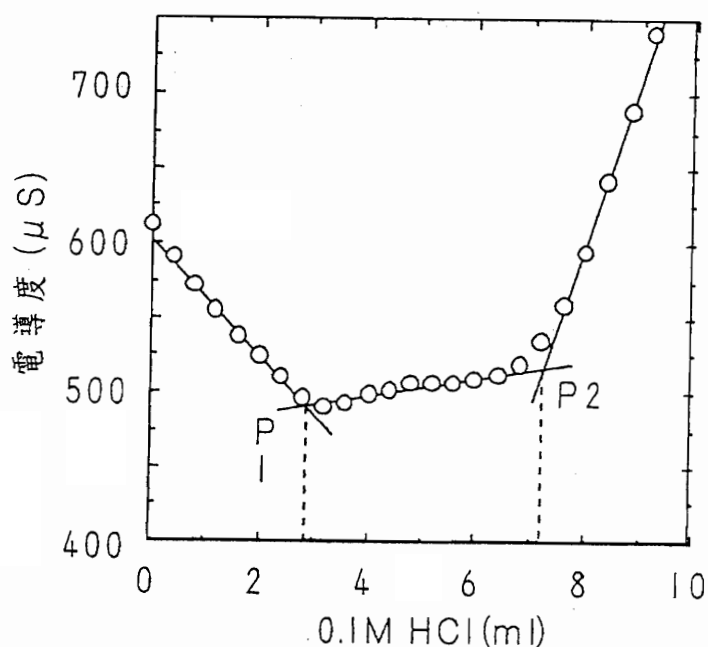
衝液種によるは測定値への影響がないことを予備実験で確認した。

IV-3：結果と考察

-3-1：BAPの特性評価

逆相懸濁重合で得られたBAP、BPポリマーゲルビーズは光学顕微鏡観察の結果、直径が100~400 μm であることが判明した。BAP、およびBPビーズ中のPBA含量はプラズマ発光分析で測定した。結果を表IV-1に示す。また、アミノ基含量は電導度滴定値とプラズマ発光分析より得られた値から算出した。

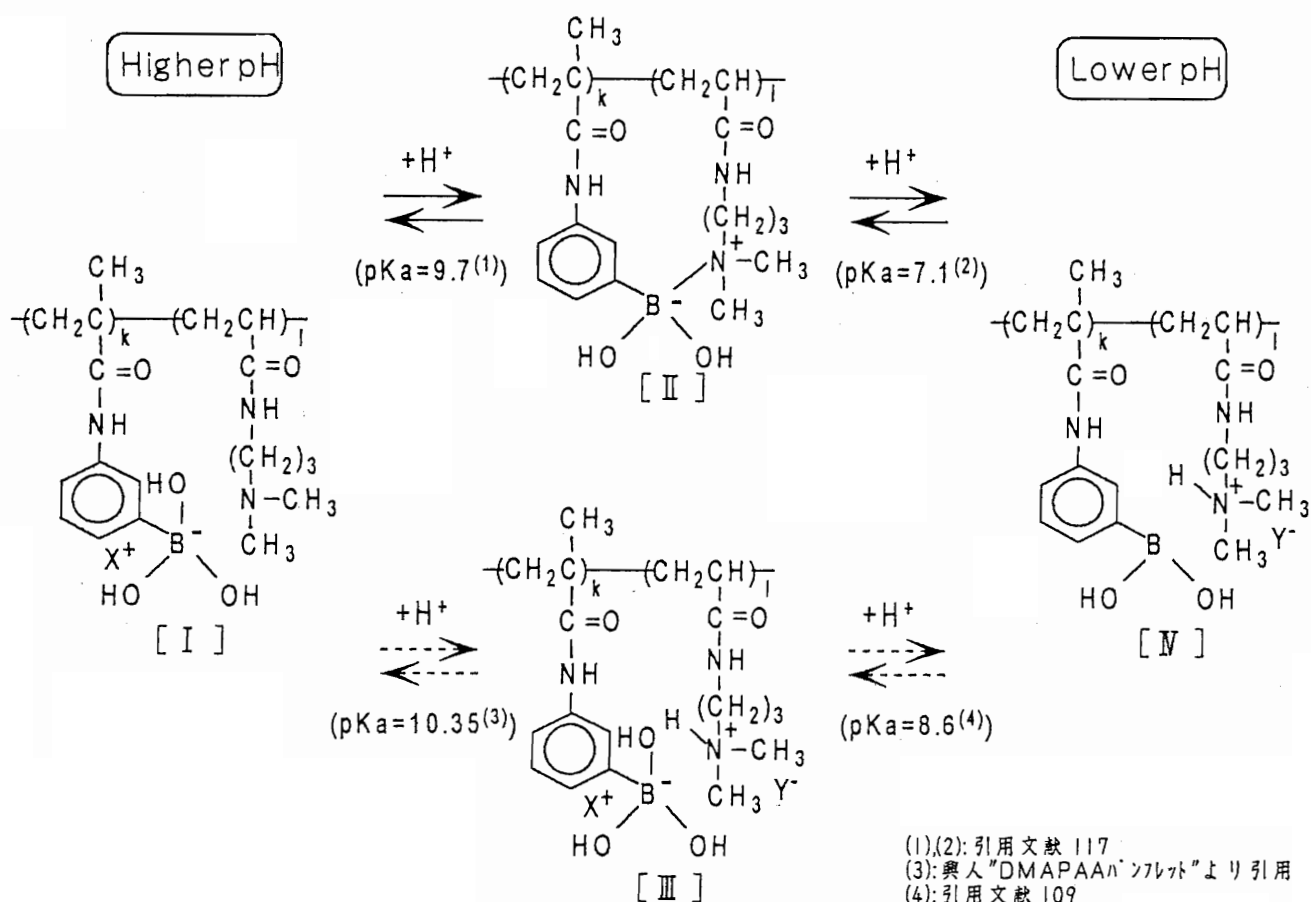
図IV-3に試料としてBAP-6.7を用いた時の電導度滴定の結果を示す。



図IV-3 BAP-6.7の電導度滴定曲線

電気電導度は系中の遊離のイオン濃度に依存して変化することが知られている。図IV-3で滴定開始点からP1までの変化は滴定前に加えた過剰のNaOHのHClによる中和に対応しており、系内の遊離の Cl^- (Specific Conductance $\lambda_{\text{Cl}^-} = 62.83 \text{ S} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, 25°C)の増加と OH^- ($\lambda_{\text{OH}^-} = 198 \text{ S} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, 25°C)の減少を反映している。図IV-3のP1からP2までの変化は図IV-4記載のBAPの構造式[I]から[IV]の変化に対応しており、滴定によって加えた H^+ はBAPのアミノ基およびPBA基に消費され、結果として遊離イオンの濃度変化は Cl^- の増加のみである。図IV-3のP2から滴定終了点までの電気電導度の変化は、加えた塩酸水溶液による遊離の Cl^- および H^+ の増加を示している。したがって、P1からP2までに消費した

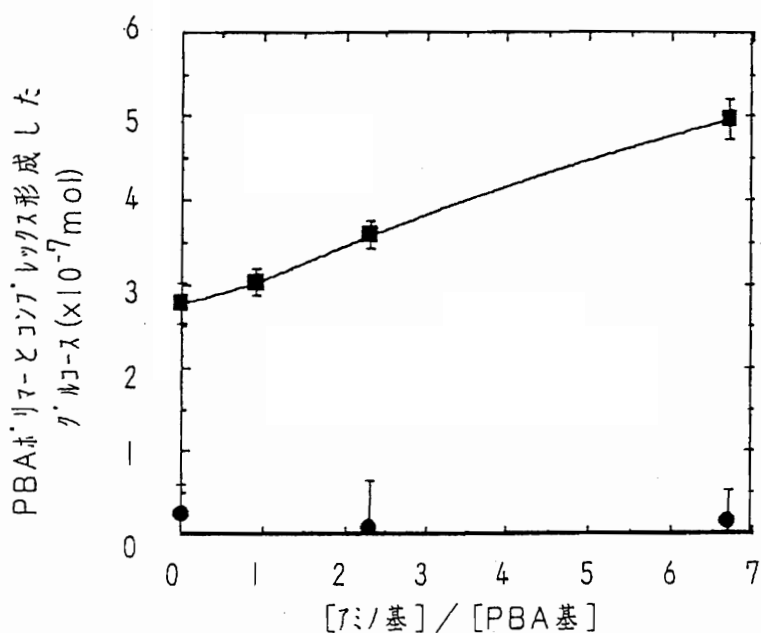
HClのモル数は系内のアミノ基とPBA基の和に対応している。したがって、BAPのアミノ基含有量は電導度滴定のP1からP2までに消費したHClのモル数から、プラズマ発光分析によって得られたPBA基の含有量を差し引くことによって得られる。得られたアミノ基含量を表IV-1に示す。



図IV-4 BAP側鎖の荷電変化

IV-3-2: 生理的pHでのグルコースのBAPへの結合性評価

図IV-5に各種アミノ基含量のPBA基を有するポリマーゲルビーズへのグルコースの結合量を示す。pH6.2ではグルコースのPBA基を有するポリマーゲルビーズへの結合量はいかなるアミノ基含量でもほぼ0であり、pH6.2ではアミノ基含量にかかわらずグルコースがPBA基とコンプレックスを形成しないことが示唆された。BP([アミノ基]/[PBA基]=0)のモデル化合物であるプロピオンアミドフェニルボロン酸のpKaは8.6であり⁷⁷⁾、BAP([アミノ基]/[PBA基]>0)のモデル化合物と考えることができるポリ(N-ビニル-2-ピロリドン-co-3-アクリルアミドフェニルボロン酸-co-DMAPAA)のpKaは7.1である⁷⁷⁾。これらのpKa値は、pH6.2で多価水酸基化合物と安定なコンプレックスを形成する4価構造のPBA基が少ないことを示唆している。



図IV-5 PBA基を有するポリマーに対するグルコースの結合量

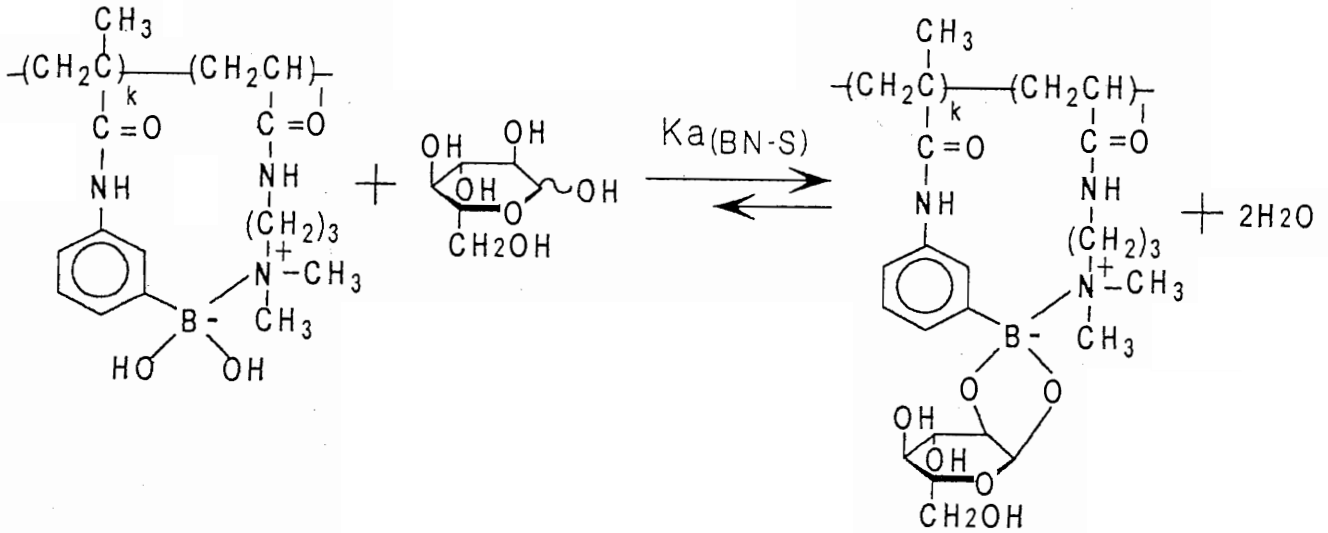
■ : pH=7.4 ● : pH=6.2

一方pH7.4では、[アミノ基]/[PBA基]の増加に応じてグルコースのPBAポリマーへのコンプレックス形成量が増加した(図IV-5)。ポリマー中のアミノ基及びPBA基の荷電が独立して変化すると仮定すると、アミノ基およびPBA基の荷電状態は図IV-4の下方に示された経路([I]↔[III]↔[IV])にしたがって変化し、そのpKaは10.35および8.6⁸⁸⁾である。しかしながら、アミノ基とPBA基を有する非架橋ポリマーであるポリ(N-ビニル-2-ピロリドン-co-3-アクリルアミドフェニルボロン酸-co-DMAPAA)のpKaは9.7と7.1である⁷⁷⁾。これらのpKaは、ポリマー中のアミノ基とPBA基の荷電状態が独立して変化するのではなく、図IV-4の上方に示された経路([I]↔[II]↔[IV])にしたがって変化し、[II]ではアミノ基の非共有電子対がPBA基に配位している可能性を示唆している。BAPもポリ(N-ビニル-2-ピロリドン-co-3-アクリルアミドフェニルボロン酸-co-DMAPAA)と同様、アミノ基とPBA基を有するユニットが用いられていることから、同様の荷電変化を示すと考えられる。

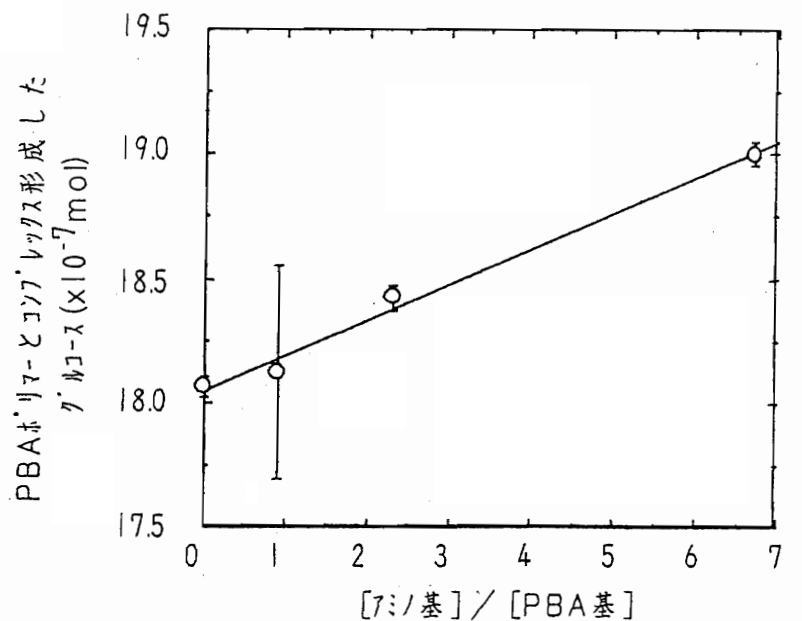
アミノ基を有さないBP(pKa8.6)の場合、pH7.4での4価状態のPBA基は式IV-1より6%と算出されるのに対して、アミノ基を有するBAPの場合、pH7.4での4価状態のPBA基の比率は、ポリ(N-ビニル-2-ピロリドン-co-3-アクリルアミドフェニルボロン酸-co-DMAPAA)のpKa7.1を用いると、67%と算出することができる。4価状態のPBA基の比率が上昇したことは生理的pH7.4でグルコースと安定なコンプレックスを形成することが可能なPBA基が増加したことを示唆している。事実、図IV-5に示したpH7.4におけるグルコースのPBA基を有するポリマーへのコンプレックス形成はアミノ基の含有量に依存して増加しているこ

とが確認された。これらのことから、PBA基を有するポリマーを用いた糖応答性インシュリン放出システムを生理的pH7.4で使用する上でアミノ基およびPBA基を有するポリマーがより好ましいことが判明した。

第II章でグルコースのBPへの結合定数($K(B-S)$; 図IV-1)が測定可能であったのに対して、グルコースのBAPへの結合定数($K(BN-S)$; 図IV-6)は図IV-1、図IV-6に示した4つの4価構造のPBA基の各々の濃度が特定できないために図IV-5に示したデータからは特定できない。



図IV-6 アミノ基とPBA基を有する材料とグルコースのコンプレックス形成

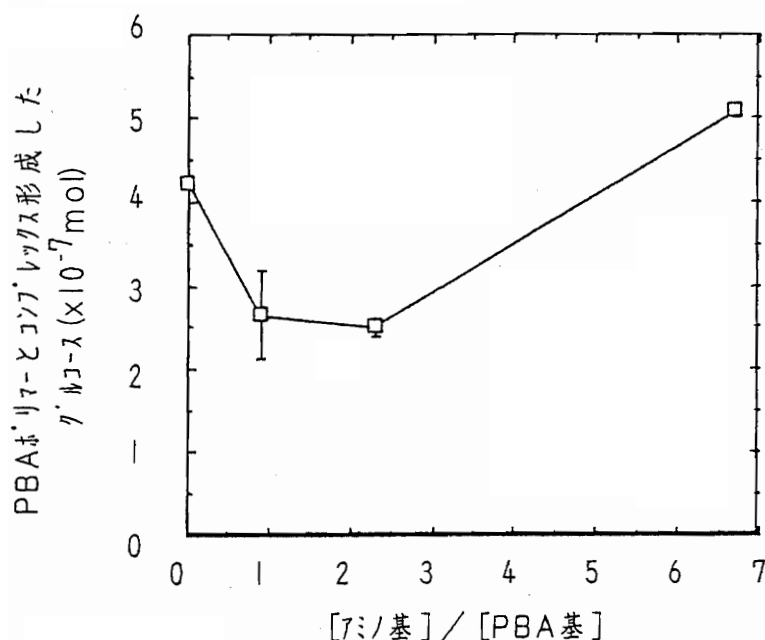


図IV-7 PBA基を有するポリマーに対するグルコースの結合量(pH=10.0)

図IV-7にpH10.0で、グルコースのPBA基を有するポリマーへのコンプレックス形成量を測定した結果を示す。図IV-7より、pH10.0でのグルコースのPBA基を有するポリマーへのコンプレックス形成量は、pH7.4の場合と同様に、[アミノ基]/[PBA基]に依存して増加することが確認されると同時に、そのコンプレックス形成量はpH7.4の場合よりかなり多いことが確認された。

pH10.0で、BPのPBA基のうち、4価状態のPBA基の比率はプロピオンアミドフェニルボロン酸の $pK_a 8.6^{77)}$ を用いて式IV-1より96.2%と算出された。一方、BAP-6.7のすべてのPBA基が図IV-4の上方に示された経路[I] \leftrightarrow [II] \leftrightarrow [IV](アミノ基の配位した4価構造を経由する平衡)をとると仮定すると、4価状態のPBA基の比率は $pK_a 7.1^{77)}$ を用いて99.9%以上と算出された。pH10.0においてBPおよびBAPはグルコースと結合するのに十分な4価のPBA基が存在するにも関わらず、グルコースがPBAポリマーにコンプレックス形成した量は、系に加えた 2.3×10^{-6} molのグルコースのうち、BPポリマーの場合で 1.8×10^{-6} mol、BAP-6.7の場合で 1.9×10^{-6} molであった。この結果はアミノ基が配位した4価のPBA基とグルコースの結合定数(図IV-6中の $K(BN-S)$)がアミノ基の配位していない4価のPBA基とグルコースの結合定数(図IV-1中の $K(B-S)$)より大きい可能性を示している。

図IV-8にpH7.4で高塩濃度(1 mol/l NaClを含む)のリン酸緩衝液を用いたときのPBAポリマーとコンプレックス形成したグルコース量のアミノ基含量依存性を示す。



図IV-8 1 mol/lの NaCl を含む pH7.4 のリン酸緩衝液を用いた時のPBA基を有するポリマーに対するグルコースの結合量 (pH=10.0)

図IV-5に示したpH7.4で100 mmol/lNaClを含む条件での実験結果と比較すると、BPポリマー([アミノ基]/[PBA基]=0)では、1 mol/lNaClを加えた系の方がグルコースとPBAポリマーのコンプレックス形成量が増加した。高塩濃度ではPBA基と多価水酸基化合物のコンプレックスが安定化されることが知られている⁷⁶⁾。しかしながら、[アミノ基]/[PBA基]=0.9、2.4では図IV-5に示した100 mmol/lNaClを含む条件の結果に比べて、PBAポリマーとコンプレックス形成したグルコースの量が減少した。この結果は系内のポリマー由来の-B-(OH)₃と-N⁺H(CH₃)₂間の配位が、加えたNaCl由来のNa⁺およびCl⁻とイオン交換し、アミノ基の配位したPBA基とグルコースの安定なコンプレックスが減少した可能性を示唆している。[アミノ基]/[PBA基]=6.7では1 mol/lNaCl、100 mmol/lNaClの条件に関わらず、ほとんど同じ量のグルコースがPBAポリマーとコンプレックスを形成した。この結果は比較的アミノ基の多いポリマーでは、NaCl濃度が1 mol/lではアミノ基のPBA基への配位を阻害するのに十分でないと考えることができる。

以上より、グルコースとPBA基のコンプレックス形成はアミノ基の導入によってその量が増加することが判明した。このことから、BAPは生理的pH7.4での生物抽出液からの多価水酸基含有化合物の分離や、糖タンパクの化学修飾時の糖鎖OH基の保護、さらには糖応答性インシュリン放出システムとして有用であると考えられる。

V. アミノ基およびPBA基を側鎖に有するポリマーを用いた生理的pHでのインシュリンの放出制御

V-1: 緒言

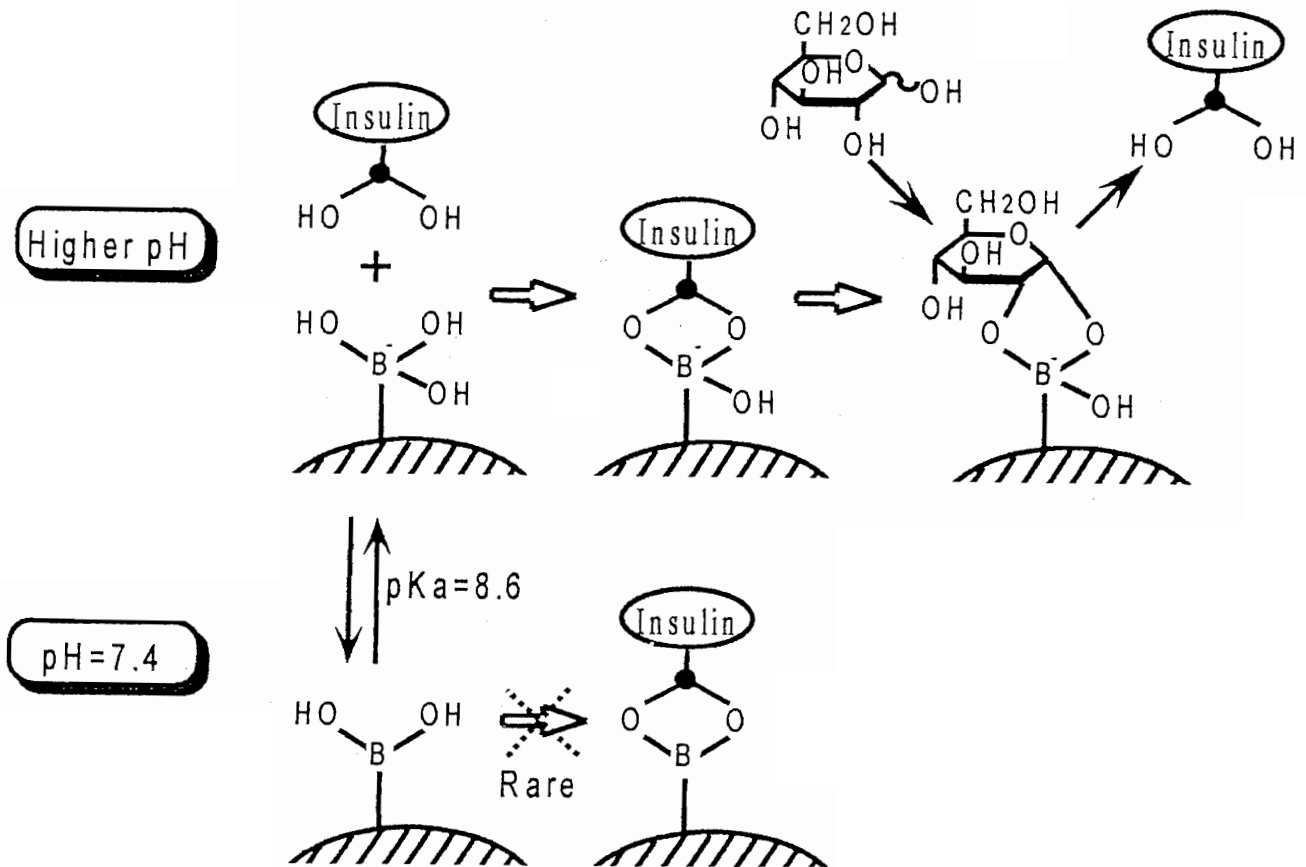


図 V-1 BP からのグルコース応答性 G-Ins 放出のメカニズム

PBA基は高pHの水溶液中では4価構造(-B(OH)₃)を、低pHでは3価構造(-B(OH)₂)を示し、アミノ基が存在しない場合、そのpKaは8.6である(図V-1左部の上下に示した平衡経路)。ここで、4価構造のPBA基はグルコースやG-Ins等の多価水酸化化合物と水溶液中で安定なコンプレックスを形成することが知られている(図V-1上部の右方向に示した反応^{50,58})。一方、図V-1下部の左右に示した3価のPBA基と多価水酸化化合物のコンプレックス形成は水溶液中では不安定であることが知られている^{50,58})。生理的pH7.4では多価水酸化化合物とPBA基の安定なコンプレックスが得られず、PBA基を有する材料を用いた糖応答性インシュリン放出システムの生体への応用が困難であった。

アミノ基はPBA基と多価水酸化化合物のコンプレックス形成を安定化する作用があることが知られている^{80,87})。前章ではPBA基とアミノ基を有する合成高分子を作製し、この

ポリマーがグルコースと生理的pHでコンプレックスを形成することを確認するとともに、アミノ基がグルコースとPBA基のコンプレックス形成を促進することを生理的pHで確認した。

本章では、糖応答性インシュリン放出システムの自律応答材料として、アミノ基とPBA基を有する材料を用い、その有用性を生理的pHで検証した。具体的には、前章の検討で生理的pHでグルコースとPBA基が最も効果的にコンプレックスを形成したBAP-6.7と、BP(比較材料)を自律応答材料として使用し、PBA基を有するポリマーゲルビーズからのG-Ins放出特性を評価した。

V-2：実験方法

V-2-1：生理的pHでの糖添加によるBAPからのG-Insの放出測定

PBA基を有するポリマー・ビーズからのG-Ins放出測定は” III-2-4に準じて行った。具体的には、20.0 mgのBAP-6.7、または10.6 mgのBP(PBA基含量= 3.5×10^{-6} mol)を0.7 mlのリン酸緩衝液(10 mol/l, pH7.4)に膨潤させ、NaOHを用いてpH7.4に再調整後に、最終体積が1 mlになるようにさらにリン酸緩衝液を加えた。また、別途40 mgのG-Insをリン酸緩衝液に最終体積が0.4 mlでpH7.4になるようにNaOHを用いて溶解した。次に膨潤ポリマーゲルビーズの上清をできるだけ除いた後に、 3.88×10^{-6} molのG-Ins溶液(236 μ l)を加え、室温で1晩放置した。このサスペンションを5 mm ϕ \times 10 mmの液体クロマトグラフィー用カラム(ファルマシア)に充填し、0.2 ml/minの条件で200分間リン酸緩衝液を流すことによってコンディショニングを行った。続いて、コンピューター・コントロール・ポンプ(802-SC、880-PU \times 2台; 日本分光)を用いて、50分間リン酸緩衝液を流し、さらに10分間200 mg/dlのグルコース(和光純薬工業)を含むリン酸緩衝液を流す操作を交互に繰り返した。このときの糖濃度を示差屈折計(830-RI; 日本分光)を用いて測定すると同時に、G-Ins濃度を蛍光検出器(820-FP; 日本分光)を用いてインシュリンの自然蛍光(Ex=275 nm、Em=304 nm)から検出した。なお、本実験の濃度でグルコース濃度、およびG-Ins濃度を独立して検出することが可能であることを予備実験より確認した。また、コンディショニング時に流出したG-Ins量は分取した流出液の275 nmでの吸光度を測定して算出した。ここで、G-Insを長期に渡って放出させる実験では、50分間リン酸緩衝液を流し、さらに10分間200 mg/dlのグルコースを含むリン酸緩衝液を流す操作を7500分間繰り返し、同様の検出を行った。なお、G-Insの放出量はコピー用紙にコピーしたクロマトグラムベースラインからのピーク重量と、あらかじめ作製したコピー用紙重量に対するG-Ins量の検量線から算出した。さらに、G-Insの放出量のグルコース濃度依存性の測定では送液するグルコース濃度を0 mg/dlから50 mg/dl(20分間)、0 mg/dl(50分間)、100 mg/dl(20分間)、0 mg/dl(50分間)、150 mg/dl(20分間)、

0 mg/dl(50分間)、200 mg/dl(20分間)、0 mg/dlと変化させ、これを繰り返し、同様のG-Ins放出測定を行った。

V-3：結果および考察

V-3-1：生理的pHでの糖添加によるBAP-6.7からのG-Insの放出パターンに関する検討

図V-2に生理的pH7.4でのグルコースの濃度変化によるBAP-6.7からのG-Insの放出の結果を示す。

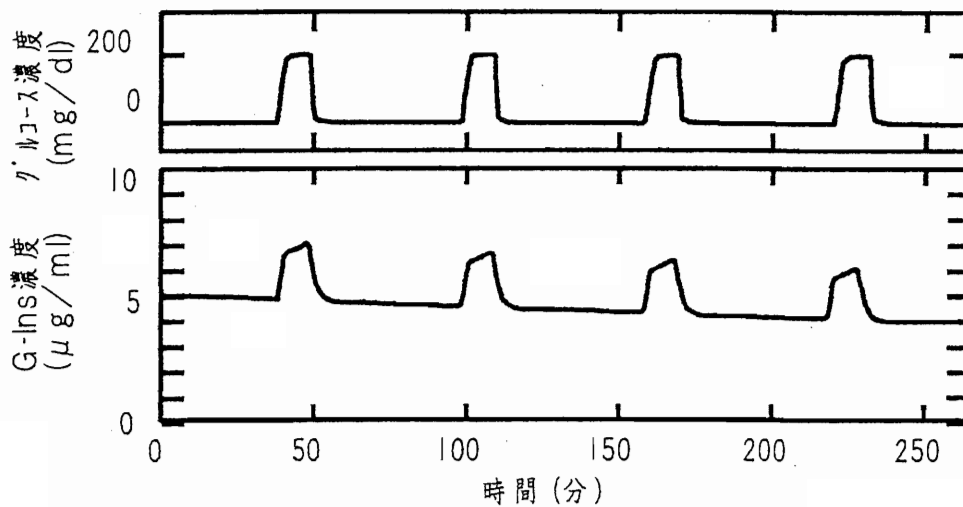
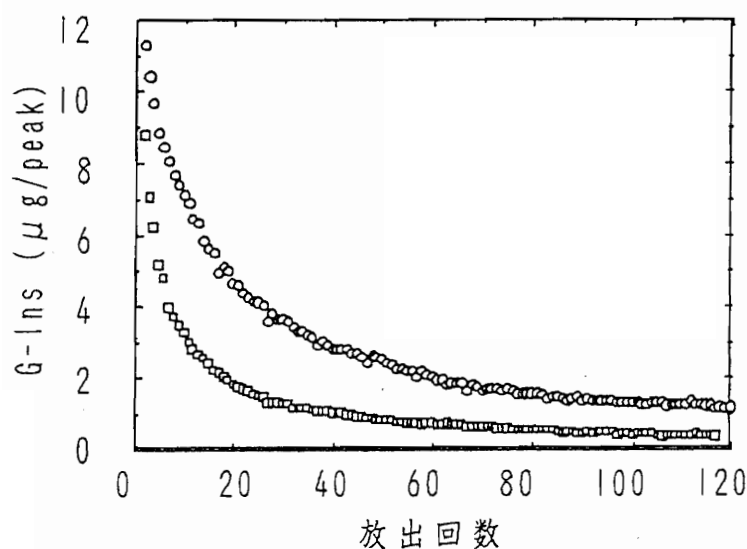


図 V - 2 グルコース濃度変化による BAP-6.7 からの G-Ins の放出

図V-2の上図は示差屈折計で測定したグルコース濃度の実測値を示し、下図は蛍光検出器で測定したG-Insの濃度を示した。図V-2より、グルコース濃度が0 mg/dlにおいてもG-Insの放出(5 μ g/ml)が確認された。PBA基とG-Insの複合体形成反応は会合状態と解離状態の平衡反応であることから、系内のG-Insの放出は解離状態のG-Insを新たに導き出し、結果としてグルコース濃度が0 mg/dlでもG-Insが放出すると考えられる。グルコース濃度を0 mg/dlから200 mg/dlに急激に変化させるとG-Insの放出量は急激に増加し、グルコース濃度の変化に応じて遅れ時間なしにG-Insの放出量が増加した。さらに、G-Insの放出量は繰り返しの放出にもかかわらず、ほぼ一定で極端な減少を示さなかった。しかしながら、200 mg/dlのグルコースを含む緩衝液を流したときのG-Insの放出量はグルコースを含まない緩衝液を流したときの1.5倍程度しか高くないことが判明した。したがって、本システムの生体応用にあたっては、グルコースが低濃度の時のG-Ins放出の抑制に関する改良が必要と考えられる。

V-3-2: 生理的pHでの糖添加によるBAP-6.7からのG-Insの長期放出評価

図V-3に図V-2と同様の実験を長時間繰り返した時のG-Insの放出量変化を示す。この実験を行うにあたっては、ボロン元素含量が 3.5×10^{-6} molのBPまたはBAP-6.7に 3.88×10^{-6} molのG-Insを添加し、一晩放置後、200分間のpH7.4のリン酸緩衝液の送液によるコンディショニングを行った。このコンディショニング後のG-Insの残存量はBPで 5.46×10^{-7} mol、BAP-6.7で 1.43×10^{-6} molであった。このことはpH7.4でのG-InsのPBA基を有するポリマーへのコンプレックス形成がBPよりBAP-6.7のほうが安定であることを示している。生理的pH7.4でのBPからのG-Insの放出量は時間の経過とともに急激に減少し、18番目のピークで $2 \mu\text{g/peak}$ のG-Insが放出されている。これに対して、BAP-6.7を用いた場合、G-Insの放出量の減少は抑制され、60番目のピークで $2 \mu\text{g/peak}$ のG-Insが放出された。さらにBAP-6.7では実験開始120時間後の120番目のピークでもG-Insが $1 \mu\text{g/peak}$ 放出していることが示された。



図V-3 PBA基を有するポリマーからのG-Insの長期放出

○: BAP-6.7, □: BP

BPポリマーのモデル化合物であるプロピオンアミドフェニルボロン酸のpKaは8.6であり、生理的pH7.4では少量のPBA基のみが4価構造であることが知られている⁸⁸⁾。この数少ない4価構造のPBA基が生理的pHでG-Insとコンプレックスを形成することができ、糖濃度変化に応じてG-Insを放出すると考えられる。事実、図V-3の結果はBPポリマーが生理的pHで糖濃度に応答してG-Insを放出することを示している。しかしながら、G-Insの放

出量は急激に減少しており、PBA基とG-Insのコンプレックス形成量が十分でないことも示された。生理的pHでBPポリマーを用いた場合、コンプレックス形成していない大半のG-Insは実験前のコンディショニング(送液)によって系外に流出すると同時に、コンプレックス形成していたG-InsもPBA基とG-Ins間の平衡を維持するために、解離する方向で図V-1上部中央から上部左へ反応が進んでいると考えることができる。これらのことから、BPポリマーは生理的pHで糖応答性インシュリン放出制御システムに応用することが困難であると思われる。

一方、BAPのモデル化合物と考えることができるポリ(N-ビニル-2-ピロリドン-co-3-アクリルアミドフェニルボロン酸-co-DMAAPAA)は生理的pH7.4で60%以上のPBA基が4価構造 $[-B(OH)_2-NR_2]$ であることから⁸⁸⁾、生理的pHで使用するインシュリン放出システムの自律応答材料としてBAPを用いた場合、BPを用いた場合に比較して、G-InsとPBA基のコンプレックス形成量が増加し、G-Insの放出挙動が向上することが期待された。実際、BPと同じ量のPBA基を有するBAPに、BPに用いたのと同量のG-Insを加え、pH7.4の緩衝液で200分間コンディショニング(送液)を行った結果、BAP-6.7がBPより多くのG-Insをポリマーに担持していることが判明した。また、長期にわたるG-Insの放出実験では、BAP-6.7を用いた場合、BPを用いた場合に比べて、G-Insの放出量の減少が顕著でなかった。これらの結果はグルコースと結合可能な4価のPBA基の数がBPよりBAPの方が多いことに由来すると考えられる。以上の結果より、生理的pHでのアミノ基とPBA基を有するポリマーゲルビーズの有用性が確認された。

牧野らはレクチン(糖結合性タンパク)であるコンカナバリンA(Con A)を用いたマイクロカプセル型の自律応答性インシュリン放出システムを報告している²⁸⁾。このシステムでは250 mg/dlのグルコースを含有する緩衝液で連続して処理した場合、 $1500 \mu\text{IU}/0.5 \text{ cm}^3/\text{day}$ の修飾インシュリン(サクシニルアミドフェニルグルコピラノシド・インシュリン)を放出することが可能である。ここで $1 \text{ IU} \doteq 41.67 \mu\text{g}$ を代入すると、この放出量は $125 \text{ ng}/\text{cm}^3/\text{day}$ と書き換えることができる。これに対して本実験のシステムは、200 mg/dlのグルコース含有緩衝液を10分間、グルコースを含まない緩衝液を50分間交互に繰り返して流した場合、図V-2のG-Ins放出量より $734 \mu\text{g}/\text{cm}^3/\text{day}$ のG-Insを放出することができる。ここで仮に $1 \text{ mg}/\text{day} = 24 \text{ IU}/\text{day}$ のインシュリン投与が必要な場合を考えると、Con A-マイクロカプセルの場合、1日に約 8000 cm^3 必要であるのに対して、本実験のPBA基を用いたシステムでは 1.36 cm^3 で十分であることが判明した。このことから、アミノ基とPBA基を有するポリマーゲルビーズを用いたシステムがよりIn vivoへの応用に適していることが確認された。

V-3-3 : 生理的pHでの糖添加によるBAP-6.7からのG-Insの放出におけるグルコース濃度依存性評価

図V-4に生理的pHで送液するグルコース濃度を0 mg/dlから50 mg/dl、100 mg/dl、150 mg/dl、200 mg/dlに変化させたときのBAP-6.7からのG-Insの放出パターンを示す。

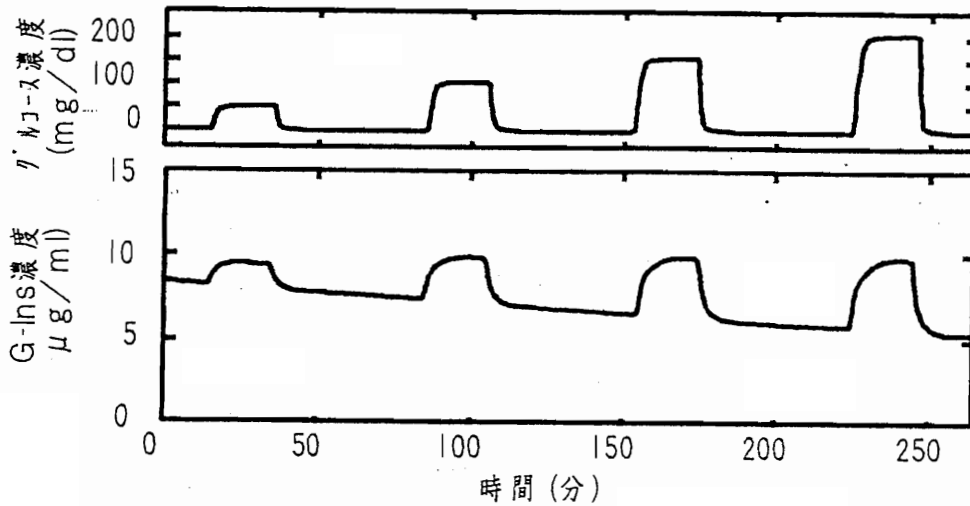


図 V - 4 各種グルコース濃度変化における BAP から G-Ins の放出

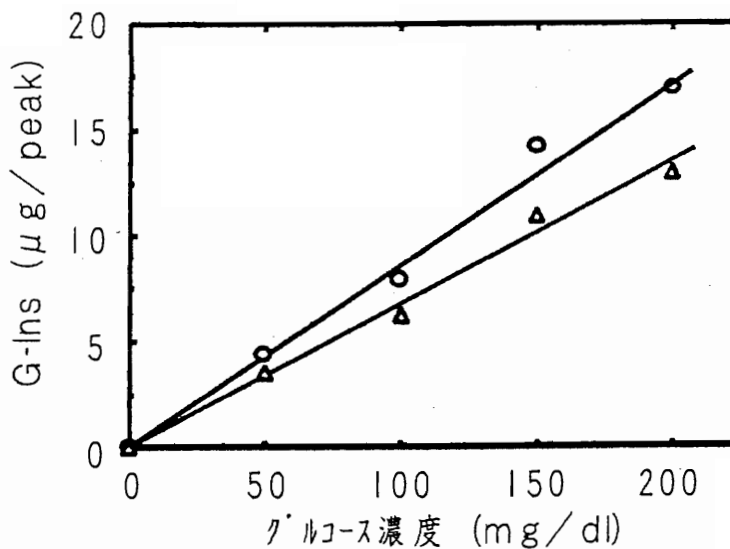


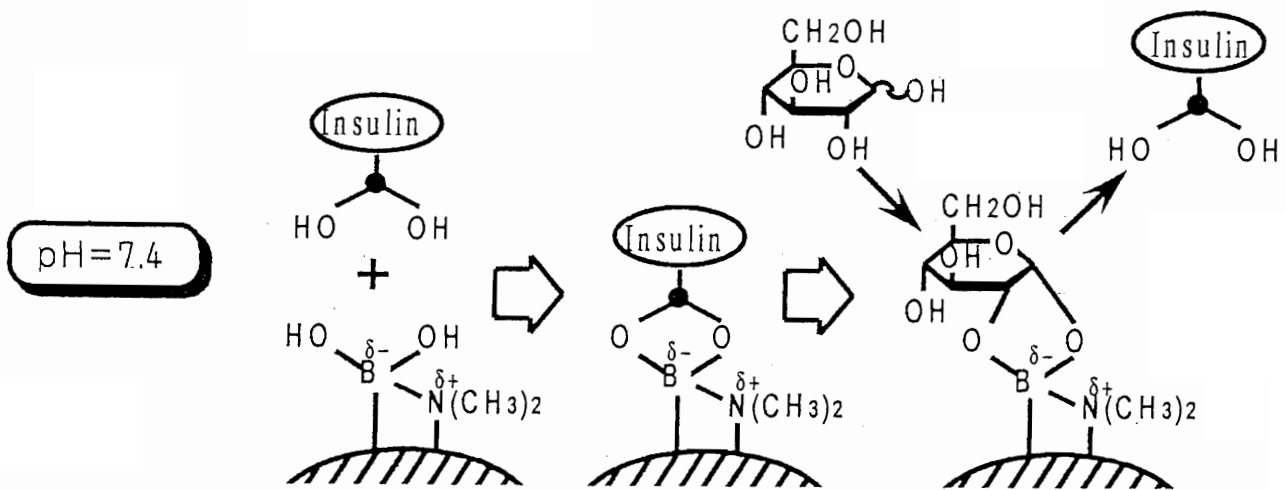
図 V - 5 グルコース濃度と G-Ins 放出量の関係

○ : 1回目、△ : 2回目

図V-4より、流したグルコース濃度に対応してG-Insの放出量が増加することが確認され

た。この傾向を明確にするために、G-Ins放出曲線のベースラインからのピーク面積より求めたG-Ins放出量をグルコース濃度に対してプロットした(図V-5)。図V-5より、G-Insのベースラインからの放出量は流したグルコース濃度に対して直線関係があることが確認された。本測定ではG-Insをカラムに再添加せずに行ったため、2回目のG-Ins放出実験(図V-5の△)ではカラム内のG-Ins量の減少に由来するG-Ins放出量の減少が観察されたものの、G-Ins放出量とグルコース濃度の直線性は維持された。健常人は摂食に応じて血糖値が70-130 mg/dlの範囲で変動し、糖尿病患者では血糖値の変動が180 mg/dl以上になることが知られている。図V-5よりBAP-6.7は0-200 mg/dlのグルコース濃度変化に应答してG-Insを放出していることから、BAP-6.7は生理的pH7.4で生体の血糖値変化の範囲に対応するグルコース濃度領域でG-Insを放出する能力を有することが確認された。

以上まとめると、PBA基とアミノ基を有するポリマーは生理的pHで緩衝液の送液時にG-Insが流出することが少なく、加えたグルコースに応じてG-Insの放出量が増し、さらに、長期にわたってグルコース濃度変化に应答して十分な量のG-Insを放出することが判明した。また、その应答はグルコースの濃度変化に遅れ時間なく対応し、流したグルコース濃度に依存することが確認された。これらの結果は生理的pHにおけるアミノ基のPBA基への配位がG-InsとPBA基間のコンプレックスを強化し、糖添加によるG-Insの放出量を増加させるというメカニズム(図V-6)を支持している。



図V-6 pH7.4におけるBAPからの糖応答性G-Ins放出のメカニズム

本章の結果から、グルコース応答性タンパク質を用いない完全合成系のアミノ基導入PBAポリマーゲルビーズが、生理的pHで使用可能な糖応答性インシュリン放出制御システムの自律応答材料として非常に有用であることが確認された。血漿タンパクや他の糖などの組成を共存させた系でのさらなる検討と、グルコース濃度が0 mg/dlでのG-Insの放出抑制の検討、さらにはPBA基と多価水酸化化合物のコンプレックス形成におけるグルコー

スの特異性向上等の検討により、人工膵島としてさらに好ましいインシュリンのON-OFF制御が可能になるであろう。

結論

本研究では糖濃度応答性インシュリン放出システムを自律応答材料を用いて達成することを目的とし、PBA基を有する材料を用いて検討を行った。

まず、各種多価水酸基化合物のPBA基を有するポリマーへの結合定数を比較検討した。その結果、多価水酸基化合物の一分子中の水酸基の数が多いこと、糖の場合開環構造がPBA基とコンプレックスを形成する上で高い結合定数を示すのに重要であることが示された。さらに、側鎖の官能基によってその値が変化することが判明した。

第III章では、PBA基を有するポリマーの糖濃度応答性インシュリン放出システムの自律応答材料としての可能性を検証した。モデル化合物(THAM-FITC)を用いた糖濃度応答性放出実験では、流したグルコース濃度変化に追従してTHAM-FITCが遅れ時間なしに放出応答することが示された。

次にインシュリンの放出実験をするのに先立って、PBAと結合可能な多価水酸基化合物によるインシュリンの修飾を行った。修飾する多価水酸基化合物としては高い結合定数を有し、インシュリンの修飾に必要な官能基を有するグルコン酸を選択した。得られた修飾インシュリン(G-Ins)は275 nmに $\epsilon=3790$ l/molを有し、修飾可能な3つのアミノ基のうち2つがグルコン酸で修飾されていることが判明した。

次に、糖濃度を変化させた時のPBA基を有するポリマーに結合させたG-Insの放出挙動をpH8.5で調べたところ、グルコース濃度が0-200 mg/dlの範囲でグルコース濃度に応じてG-Insを放出することを確認した。また、G-Insの放出濃度はグルコース濃度と直線関係にあることが判明した。これらのことから、PBA基を側鎖に有するポリマーが糖濃度応答性インシュリン放出システムに応用可能であることが確認された。

第IV章では、このシステムを生理的pH7.4で実現するのに先立って、アミノ基とPBA基を有する架橋共重合体ゲルビーズを作製し、グルコースとのコンプレックス形成能に関する検討を行った。pH6.2では、グルコースはアミノ基含量に関係なくPBA基を有するポリマーとコンプレックス形成しなかった。これに対して、pH7.4、8.5では、[アミノ基]/[PBA基]の増加に応じてグルコースのPBA基を有するポリマーへの結合量が増加した。このことはアミノ基の非共有電子対がPBA基に配位することによって、PBA基とグルコースのコンプレックスが安定化したことを示唆している。

第V章では、アミノ基とPBA基を有するポリマーを用いた生理的pH7.4での糖添加によるG-Insの放出に関する検討を行った。生理的pH7.4でアミノ基を有さずPBA基のみを有するポリマーを用いた場合、G-Insの放出量は急激に減少したのに対して、アミノ基とPBA基を有するポリマーを用いた場合、G-Insの放出量は複数回の繰り返しの放出実験を行っても、その放出減少量は少なかった。また、G-Insの放出はグルコース濃度の変化に応じて遅れ時間なしに非常に感度よく応答した。本実験のG-Ins放出量は $734 \mu\text{g}/\text{cm}^3/\text{day}$ であ

り、仮に1 mg/day=24 IU/dayのインシュリン投与が必要な場合を考えると、1日に必要なポリマー容量は1.36 cm³と少量であることから、このシステムがIn vivoへの応用に適していることが判明した。

引用文献

1. D. S. Schade, and R. P. Eaton, "A clinician's guide to subcutaneous insulin injection based on the kinetics of insulin absorption from subcutaneous tissue" in *Diabetic Management in the 80's*, Ed. by C.M.Peterson, Preager, New York, (1982) pp. 110-115
2. G. B. Bolli, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 6 (1989) S3
3. C. Binder, T. Lauritzen, O. Faber, and S. Pramming, *Diabetes Care*, 7 (1984) 188
4. E. A. Masson, D. McAughey, D. Davies, and A. J. M. Boulton, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 7 (1989) 57
5. M. A. Gall, E. R. Mathiesen, P. Skott, L. Musaeus, S. Damm, H. B. Nielsen, and H. H. Parving, *Diabetes Res.*, 11 (1989) 97
6. 佐々木英夫、富永真琴監訳、「UNGER & FOSTER 糖尿病学」、HBJ出版局、(1988) pp. 48-73
7. Y. Hashiguchi, M. Sakakida, K. Nishida, T. Uemura, K. Kajiwara, and M. Shichiri, *Diabetes Care*, 17 (1994) 387
8. M. Shichiri, R. Kawamori, N. Asakawa, Y. Yamasaki, N. Hakui, and Y. Goriya, "Blood glucose regulation in ambulant diabetics with the wearable artificial endocrine pancreas: Closed-loop IV versus SC insulin infusion" in *Progress in Artificial Organs-1985*, Ed. by Y. Nose, C. Kjellstrand, and P. Ivanovich, ISAO Press, Cleveland, (1986) pp. 695-699
9. M. Shichiri, H. Kishikawa, M. Sakakida, K. Kajiwara, Y. Hashiguchi, K. Nishida, T. Uemura, Y. Konno, and K. Ichinose, *Diabet. Res. Clin. Pract.*, 24 (1994) S251
10. D. E. R. Sutherland, A. Gruessner, and K. Moundry-Munns, *Clin. Transplant.*, 4 (1991) 31
11. W. J. Irvine, R. S. Gray, and J. M. Steel, "Islet cell antibody as a marker for early stage type 1 diabetes mellitus" in *Immunology of diabetes*, Ed. by W. J. Irvine, Tevot Scientific Publications, Edinburgh, (1980) pp. 117-154
12. N. K. Maclaren, S. W. Huang, and J. Fogh, *Lancet*, MAY 3 (1975) 997
13. D. W. Scharp, C. J. Swanson, B. J. Olack, P. P. Latta, O. D. Hegre, E. J. Doherty, F. T. Gentile, K. S. Flavin, M. F. Ansara, and P. E. Lacy, *Diabetes*, 43 (1994) 1167
14. C. G. Groth, O. Korsgren, A. Tibell, J. Tollemar, E. Moller, J. Bolinder, J. Ostman, F. P. Reinholt, C. Hellerstrom, and A. Andersson, *Lancet*, 344 (1994) 1402

15. H. Ohgawara, N. Mochizuki, T. Taira, S. Nishijima, N. Iwasaki, R. Yui, Y. Hirata, and T. Hayakawa, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **24** (1990) 348
16. H. Iwata, H. Amemiya, T. Matsuda, H. Takano, and T. Akutsu, *J. Bioact. Compat. Polym.*, **3** (1988) 356
17. H. J. Sanders, *C & EN*, April 1 (1985) 30
18. D. Brooke, and R. J. Washkuhn, *J. Pharm. Sci.*, **66** (1977) 159
19. Y. Okuyama, R. Yoshida, K. Sakai, T. Okano, and Y. Sakurai, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **4** (1993) 545
20. S. W. Kim, R. V. Peterson, and J. Feijen, "Polymeric drug delivery systems" in *Drug Design*, Vol. X, Ed. by E. J. Ariens, Academic Press, New York, (1980) pp. 193-250
21. M. Chasin, and R. Langer, "Biodegradable polymers as drug delivery system", Marcell Dekker Inc., New York, (1990)
22. F. Theeuwes, *J. Pharm. Sci.*, **64** (1975) 1987
23. T. Okano, N. Yui, M. Yokoyama, and R. Yoshida, "Advances in polymer systems for drug delivery, Japanese technology reviews, Section E: Biotechnology", Gordon and Breach Science Publishers SA, Switzerland, (1994)
24. D. R. Friend, and G. W. Chang, *J. Med. Chem.*, **27** (1984) 261
25. Y. Matsuura, and H. Maeda, *Cancer Res.*, **46** (1986) 6387
26. M. Goto, H. Yura, C. W. Chang, A. Kobayashi, T. Shinoda, A. Maeda, S. Kojima, K. Kobayashi, and T. Akaike, *J. Control. Rel.*, **28** (1994) 223
27. S. Sato, S. Y. Jeong, J. C. McRea, and S. W. Kim, *J. Control. Rel.*, **1** (1984) 67
28. K. Makino, E. J. Mack, T. Okano, and S. W. Kim, *J. Control. Rel.*, **12** (1990) 235
29. G. Albin, T. A. Horbett, and B. D. Ratner, *J. Control. Rel.*, **2** (1985) 153
30. K. Ishihara, and K. Matsui, *J. Polym. Sci., Part C: Polym. Lett.*, **24** (1986) 413
31. Y. Ito, M. Casolaro, K. Kono, and Y. Imanishi, *J. Control. Rel.*, **10** (1989) 195
32. R. A. Siegel, and B. A. Firestone, "Mechanochemical approaches to self-regulating insulin pump design" in *Advances in drug delivery systems 4*, Ed. by J. M. Anderson, S. W. Kim and K. Knutson, Elsevier Science Publishers Company Inc, New York, (1990) pp. 181-192
33. J. Ricka, and T. Tanaka, *Macromolecules*, **17** (1984) 2916
34. R. A. Siegel, M. Falamarzian, B. A. Firestone, and B. C. Moxley, *J. Control. Rel.*, **8** (1988) 179
35. N. A. Peppas, and J. Kiler, *J. Control. Rel.*, **16** (1991) 203
36. T. Okano, Y. H. Bae, and S. W. Kim, "Temperature responsive controlled drug delivery" in *Pulsed and Self-Regulated Drug Delivery*, Ed. by Joseph Kost, CRC Press, Boca Raton, Florida, (1990) pp. 17-46

37. T. Okano, Y. H. Bae, H. Jacobs, and S. W. Kim, *J. Control. Rel.*, 11 (1990) 255
38. R. Yoshida, K. Sakai, T. Okano, and Y. Sakurai, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11 (1993) 85
39. A. S. Hoffman, *J. Control. Rel.*, 6 (1987) 297
40. T. Aoki, M. Kawashima, H. Katono, K. Sanui, N. Ogata, T. Okano, and Y. Sakurai, *Macromolecules*, 27 (1994) 949
41. K. Sawahata, M. Hara, H. Yasunaga, and Y. Osada, *J. Control. Rel.*, 14 (1990) 253
42. I. C. Kwon, Y. H. Bae, T. Okano, B. Berner, and S. W. Kim, *Makromol. Chem., Macromol. Symp.*, 33 (1990) 265
43. I. C. Kwon, Y. H. Bae, and S. W. Kim, *Nature*, 354 (1991) 291
44. N. Negishi, T. Iida, K. Ishihara, and I. Shinohara, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, 2 (1981) 617
45. T. Onak, "Organoborane chemistry", Academic Press, New York, (1975)
46. H. Steinberg, "Organoboron Chemistry, Vol. I-III", John Wiley and Sons, New York, (1964)
47. J. Boeseken, *Adv. Carbohyd. Chem.*, 4 (1949) 189
48. W. J. Evans, E. J. McCourtney, and W. B. Carney, *Anal. Biochem.*, 95 (1979) 383
49. R. F. Nickerson, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 30 (1968) 1447
50. S. A. Barker, A. K. Chopra, B. W. Hatt, P. J. Somers, *Carbohyd. Res.*, 26 (1973) 33
51. S. Aronoff, T. Chen., and M. Cheveldayoff, *Carbohyd. Res.*, 40 (1975) 299
52. C. Zittle, *Advan. Enzym.*, 12 (1951) 493
53. S. Angyal, D. Greeves, and V. Pickles, *Carbohyd. Res.*, 35 (1974) 165
54. R. Shapiro, M. J. McManus, C. Zalut, and H. F. Bunn, *J. Biol. Chem.*, 255 (1980) 3120
55. S. Weitzman, V. Scott, and K. Keegstra, *Anal. Biochem.*, 97 (1979) 438
56. D. Matthews, R. Alden, J. Birktoft, S. Freer, and J. Kraut, *J. Biol. Chem.*, 250 (1975) 7120
57. R. E. Rippere, and V. K. LaMer, *J. Phys. Chem.*, 47 (1943) 204
58. P. A. Sienkiewicz, and D. C. Roberts, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 42 (1980) 1559
59. J. P. Lorand, and J. O. Edwards, *J. Org. Chem.*, 24 (1959) 769
60. C. Löwe, and P. Dean, "Affinity chromatography", John Wiley and sons, New York, (1974)
61. I. M. Chaiken, *Anal. Biochem.*, 97 (1979) 1
62. G. Wulff, and J. Haarer, *Makromol. Chem.*, 192 (1991) 1329
63. S. A. Barker, B. W. Hatt, P. J. Somers, and R. R. Woodbury, *Carbohyd. Res.*, 26 (1978) 55
64. H. Schott, E. Rudloff, P. Shmidt, R. Roychoudhury, and H. K=ssel, *Biochemistry*, 12 (1973) 932
65. H. L. Weith, J. L. Weibers, and P. T. Gilham, *Biochemistry*, 9 (1970) 4396
66. V. Bouriotis, I. J. Galpin, and P. D. G. Dean, *J. Chromatogr.*, 210 (1981) 267

67. S. X. Cai and F. W. Keana, *Bioconjugate Chem.*, 2 (1991) 317
68. T. Burnett, H. Peebles, and J. Hageman, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 96 (1980) 157
69. H. Miyazaki, A. Kikuchi, Y. Koyama, T. Okano, Y. Sakurai and K. Kataoka, *Biochem. Biophys. Res. Comn.*, 829 (1993) 195
70. S. Kitano, K. Kataoka, Y. Koyama, T. Okano and Y. Sakurai, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, 12 (1991) 227
71. S. Kitano, Y. Koyama, K. Kataoka, T. Okano, and Y. Sakurai, *J. Control. Rel.*, 19 (1992) 162
72. K. Kasai, and S. Ishii, *J. Biochem.*, 84 (1978) 1051
73. L. Nichol, A. Ogston, D. Winzor, and W. Sawyer, *Biochem. J.*, 143 (1974) 435
74. G. W. Dickinson, and V. A. Fassel, *Anal. Chem.*, 41 (1969) 1021
75. R. H. Scott, V. A. Fassel, R. N. Kniseley, and D. E. Nixon, *Anal. Chem.*, 46 (1974) 75
76. M. Rosenberg, J. L. Wiebers, and P. T. Gilham, *Biochemistry*, 11 (1972) 3623
77. S. Kitano, I. Hisamitsu, Y. Koyama, K. Kataoka, T. Okano, M. Yokoyama, and Y. Sakurai, "Preparation of glucose-responsive polymer complex having phenylboronic acid moiety and its application to insulin-releasing device" in Proceedings of the first international conference on intelligent materials, Ed. by T. Takagi, K. Takahashi, M. aizawa, and S. Miyata, Technomic publishing CO., INC., Pennsylvania U.S.A., (1993) pp. 383-388
78. S. R. Maple, and A. Allerhand, *J. Am. Chem. Soc.*, 109 (1987) 3168
79. R. R. Maestas, J. R. Prieto, G. D. Kuehn, J. H. Hageman, *J. Chromatogr.*, 189 (1980) 225
80. G. Wulff, and W. Vesper, *J. Chromatogr.*, 167 (1978) 171
81. L. A. Seminoff, G. B. Olsen, and S. W. Kim, *Int. J. Pharmac.*, 54 (1989) 241
82. D. G. Lindsay, and S. Shall, *Biochem. J.*, 121 (1971) 737
83. M. Hashimoto, K. Takada, Y. Kiso, and S. Muranishi, *Pharmac. Res.*, 6 (1989) 171
84. W. W. Bromer, S. K. Sheehan, A. W. Berns, and E. R. Arquilla, *Biochemistry*, 6 (1967) 2378
86. 永井克也、” 糖尿病－糖代謝” 「病気を理解するための生理学・生化学」、奥田拓道、高田明和、前田浩、編、金芳堂、(1985) pp. 1-30
85. D. J. McCardin, *Chem. Rev.*, 60 (1960) 39
87. P. M. Gallop, M. A. Paz, and E. Henson, *Science*, 217 (1982) 166
88. S. Kitano, I. Hisamitsu, Y. Koyama, K. Kataoka, T. Okano, and Y. Sakurai, *Polymers for Advanced Technologies*, 2 (1991) 261
89. I. Miwa, J. Okuda, K. Maeda, and G. Okuda, *Clin. Chim. Acta.*, 37 (1972) 538