交互累積法による機能性ナノ薄膜及びマイクロカプセルの開発

佐藤 勝彦

Development of Functional Multilayer Nanofilms and Microcapsules
Based on Layer-by-Layer Deposition Techniques

Katsuhiko Sato

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University;
6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan.

(Received May 28, 2015)

Functional multilayer thin films have been prepared by layer-by-layer (LbL) deposition for the development of sensors, separators, and drug delivery systems. In particular, glucose-sensitive LbL films have been widely studied for use as glucose sensors and in glucose-triggered drug delivery systems. In this work, I report on glucose-sensitive LbL films that consist of concanavalin A (ConA), phenylboronic acid (PBA), and glucose oxidase (GOx). ConA/glycogen LbL films were prepared by LbL deposition of ConA and glycogen through a lectin-sugar interaction. Similarly, PBA-modified poly(amidoamine) dendrimer/poly(vinyl alcohol) (PVA) LbL films were prepared through cyclic boronate ester bonds. Both types of films decomposed in the presence of glucose, by the competitive binding of glucose, although these LbL films did not show a satisfactory response to millimolar concentrations of glucose under physiological conditions. PBA-modified poly(allylamine hydrochloride) and PVA films were prepared on a GOx-modified quartz slide. The LbL film was stable over a wide pH range, from 3.0 to 9.0, in the absence of glucose. In contrast, the film decomposed upon exposure to 0.1–10 mM glucose solutions for 60 min at pH 7.4. The glucose-induced decomposition of the film can be explained by the scission of the carbon–boron bond of the PBA residues by hydrogen peroxide, which was produced through the GOx-catalyzed oxidation of glucose. These results suggest this multilayer film may be useful for the development of glucose-sensitive drug delivery systems.

Key words—layer-by-layer (LbL) film; microcapsule; glucose response; phenylboronic acid

1. 交互累積膜法とは

交互累積膜法は薄膜作製技術の1つであり、金属や石英などの基板をポリカチオンとポリアニオンの溶液に交互にひたすことにより静電的相互作用によって基板表面にナノメートルレベルの多層膜を作製する (Fig. 1).¹⁾ 近年では、多層膜形成の駆動力として静電的相互作用のほかにも糖–レクチン結合²⁾やアビジン–ビオチン結合³⁾などの生物学的な親和性及びシクロデキストリンなどを利用したホスト–ゲスト結合⁴⁾や水素結合などの弱い結合⁵⁾も利用されている。このように相互に結合する2種以上の高分子を用いることで累積膜を作製することができ

る。この方法は、薄膜を構成する材料を自由に選択できること、特殊な技術や装置を必要としないこと、すべての工程を水溶液中及び温和な条件で行えることなどの利点があり幅広い分野で利用されている。

また、交互累積膜法によりマイクロカプセルを作製することができる。^{6,7)} はじめに、ナノ～マイクロメートルサイズの球状微粒子の表面に累積膜を被覆してカプセル膜を形成し、その後、微粒子を適当な方法で溶解除去することにより中空のカプセルとする (Fig. 2)。累積膜と同様の利点を有し生体試料を利用した機能性カプセルの開発に有用である。^{8–10)} このようにして合成高分子、¹⁾ デンドリマー、¹¹⁾ 超分子、¹²⁾ タンパク質、¹³⁾ 微粒子¹⁴⁾ など様々な材料から累積膜が作製され、光学及び電気化学センサーの表面修飾、^{14,15)} pH やイオンなどの刺激応答、^{16,17)} 薬物放出制御¹⁸⁾ のような機能性ナノ薄膜

東北大学大学院薬学研究科 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

e-mail: satok@m.tohoku.ac.jp

本総説は、平成26年度日本薬学会東北支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. An Experimental Procedure of Layer-by-Layer Deposition of Thin Films

Fig. 2. Preparation Process of Layer-by-Layer Microcapsule

やマイクロカプセルの開発に利用されている。^{19,20)} 筆者はこれまで交互累積膜法を用いて種々の機能性薄膜の開発を行ってきた。本稿では特にグルコース刺激によって分解する累積膜及びカプセルについて紹介する。

2. Concanavalin A を用いたグルコース応答交互累積膜

コンカナバリン A (concanavalin A; ConA) はタチナタマメなどに含まれる分子量 104000 の糖結合タンパク質 (レクチン) であり、4 量体の各サブユニットに 1 ヲ所の糖結合部位を有し糖類と可逆的に結合することが知られている (Fig. 3)。既に ConA のこのような性質を利用した糖センサーが多数報告されており、^{6,21-23)} 筆者も ConA と糖鎖の結合を利用することで累積膜を作製することができると考えた。また、この結合は可逆であることからグルコースの競合作用による膜の分解応用が期待できた。つまり、累積膜にグルコースを添加すると、累積膜内部で ConA と結合している糖鎖がグルコースと置換するため、累積膜形成の駆動力である ConA と糖鎖間の結合が切断され累積膜が分解すると考えた (Fig. 4)。

はじめに、ConA と累積膜を形成することのできる糖鎖について検討を行ったところ、グリコーゲン

Fig. 3. Complexation between Concanavalin A and Sugar

(glycogen; Gly) を用いることで良好な累積膜の形成が確認できた。²⁾ Gly はグルコースユニットが連なった糖鎖であり ConA と特異的に結合し凝集することが知られている。また、累積膜の調製に用いる Gly 溶液に 10 mM のグルコースを共存させると累積膜は形成しなかった。このことはグルコースの競合作用により ConA-Gly 結合の形成が阻害されている結果であり、ConA/Gly 累積膜形成の駆動力が疎水的吸着などの非特異的な吸着ではなく ConA 由来のレクチン結合に基づいていることを示している。

次に、ConA/Gly 累積膜の糖応答性を調査した。Figure 5 は累積膜を糖溶液に浸漬したときの残存率を表している。その結果、ConA/Gly 累積膜の分解速度は添加した糖類と ConA との親和性の強さ、及び濃度に依存した。すなわち、ConA と非常に高い親和性を持つメチルマンノースとメチルグルコースは添加後の 10 分間でそれぞれ 1 mM 及び 5 mM において高い応答性を示した (ConA とメチルマンノース及びメチルグルコースの結合定数はそれぞれ $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $4.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$)。²⁴⁾ また、マンノースも高い親和性を持つことから Gly とよく置換することが推測でき、グルコースよりも低濃度で累積膜は分解した (ConA とマンノース及びグルコース結合定数はそれぞれ $2.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $0.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$)。²⁵⁾ 累積膜をほぼ分解するためにマンノースとグルコースでそれぞれ 20 mM 及び 50 mM を必要とした。一方、ConA/Gly 累積膜はガラクトースに対してはほとんど分解しなかった。この理由として、ConA はマンノース結合型レクチンであるためガラクトースは ConA とほとんど結合することができず ConA-Gly 結合に影響しなかったと考えられる。これらの結果は、明らかに ConA と糖の親和性の程度に依存して ConA/Gly 累積膜が分解していることを示している。

Fig. 4. Schematic Illustration of Sugar-induced Disintegration of Concanavalin A/Sugar-polymer Multilayer Assembly

Fig. 5. Effects of the Concentration of Glucose (● in panel A), Mannose (○ in panel A), Methyl-glucose (panel B), and Methyl-mannose (panel C) on the Rate of Disintegration of the ConA-Glycogen Multilayer Film (10 bilayers)

The concentration of the sugar was as follows: (panel A) (a) 5 mM, (b) 10 mM, (c) 20 mM, (d) 50 mM, and (e) 100 mM; (panel B) (a) 5 mM and (b) 20 mM; (panel C) (a) 1 mM and (b) 2 mM.

3. Concanavalin A を用いたグルコース応答マイクロカプセル

グルコースに応答する交互累積膜の調製ができたので、これをカプセル膜としたマイクロカプセルの作製及び糖刺激によるインスリン放出応答を調査した.²⁶⁾ はじめに、カプセル作製のためテンプレートとして用いる微粒子について検討を行った。通常、交互累積膜法によるカプセル作製にはメラミン-ホルムアルデヒド樹脂や二酸化ケイ素の微粒子が用いられるが、それぞれ強酸及び HF のような過酷な溶解条件を必要とするため機能性タンパク質のカプセル化には適していない。また、これらの微粒子を用いた場合にはインスリンを効果的に封入することが困難である。そこで、筆者は CaCO_3 粒子を用いることにした。条件検討を行い、粒形制御のためのポリスチレンスルホン酸を含む Na_2CO_3 水溶液とインスリンを含む CaCl_2 水溶液を混合することで直径およそ $2\ \mu\text{m}$ のインスリンを内部に取り込んだ CaCO_3 粒子を調製することに成功した。 CaCO_3 粒子はカプセル膜被膜後に緩衝溶液中での

ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 処理で溶解除去することが可能である.²⁷⁾ この粒子を鋳型としてカプセル作製を行ったところ、残念ながら ConA と Gly のみの累積膜では強度不足であり EDTA 処理に耐えることができなかった。そこで、カプセル膜の内外に補強のためのポリエチレンイミン及びポリスチレンスルホン酸のような高分子電解質層を補うことで ConA/Gly 層を含むカプセルの作製に成功した。このカプセルの糖応答性は累積膜の場合と同様であり糖の種類及び濃度に依存した。グルコースに対しては 50–100 mM 程度で分解し、それに伴うインスリンの放出が確認できた。これらの応答は明らかに ConA とグルコースとの親和性に由来しておりレクチン活性を維持したまま ConA をカプセル膜に導入できたことを示している。この手法は生体試料を用いたマイクロカプセルの開発に有用であり、実際に筆者らはこの研究のほかにもアビジンや酵素をカプセル膜に導入したカプセルの開発に成功している.²⁸⁾

Fig. 6. PBA Complexation with Diol

Fig. 7. Oxidation of Boronate Ester to Phenol by H_2O_2

Fig. 8. A Schematic Illustration of Glucose-induced Decomposition of PBA-PAH/PVA Multilayer Film

4. Phenylboronic acid を用いたグルコース応答薄膜

レクチンや酵素などの機能性タンパク質を分子認識素子としたグルコース応答薄膜が多数報告されている。生体試料を用いることで高い感度と特異性が得られるが、長期の使用において生理的条件下では活性の低下は避けられず性能の低下を避けることはできない。また、コストの点も問題である。このような問題を回避するため低分子化合物を分子認識素子とすることで安定で安価なシステムを開発することが期待できる。フェニルボロン酸 (phenylboronic acid; PBA) はジオール構造を持つ化合物と環状エ

ステル結合を形成する。この結合は可逆的なため競合物質であるグルコースなどの糖類により置換され再分割される (Fig. 6)。既に PBA のこのような性質は糖類のセンシングに利用されており、これまでに蛍光変化や色調変化としてグルコースを検出する PBA 誘導体など数多く報告されている。²⁹⁻³²⁾

そこで、PBA とジオールとの結合を駆動力とした交互累積膜の調製と糖応答性について調査を行った。³³⁾ 種々の条件を検討したところ PBA を末端アミンに修飾した PAMAM デンドリマー (PBA-D) と、ジオール構造を持つ高分子としてポリビニルアルコール (polyvinyl alcohol; PVA) を用いること

Fig. 9. Typical QCM Response for the Preparation of GOx (PBA-PAH/PVA)₅ Multilayer Film and Its Glucose-induced Decomposition at pH 7.4 in 10 mM HEPES Buffer Solution

で累積膜を作製することができた。この PBA-D/PVA 累積膜の糖応答性はフルクトースの置換効果により 10 mM において完全な分解が確認できた。しかし、グルコースに対しては分解率は数%のみであった。理由として PBA とグルコースの親和性が小さいことと（フルクトース 160 M^{-1} 、グルコース 4.6 M^{-1} ）³⁴⁾が挙げられる。応答性改善のためグルコース親和性のより強い PBA 誘導体を用いて同様の検討を行ったがそれでも十分な分解応答は得られなかった。

5. H_2O_2 による PBA の酸化反応を利用したグルコース応答累積膜

PBA とグルコースの親和性が小さいため競合作用による膜分解は起こらなかった。そこで、PBA が H_2O_2 によりフェノールへと酸化される化学反応に注目した (Fig. 7)。この反応は H_2O_2 に対して中性の水溶液中においても鋭敏に進行するため、活性酸素種の検出及び薬物送達システムの開発などにも用いられている。³⁵⁻³⁹⁾ この反応とグルコースオキシダーゼ (glucose oxidase; GOx) の酵素反応を組み合わせたグルコース応答機構を検討した。Figure 8 に示すように、GOx によりグルコースから生成された H_2O_2 が累積膜形成の駆動力であるポロン酸エステル結合を開裂することにより膜が分解することを期待した。

はじめに PBA が 25% 程度修飾されたポリアリルアミン (PBA-PAH) と PVA より累積膜を作製し H_2O_2 に対する分解応答について調査を行った。⁴⁰⁾ その結果、この薄膜は pH 変化やイオン強度、競合物質である糖類に対して安定であるが、0.1 mM 程度の H_2O_2 に対して鋭敏な分解応答を示した。そこで、GOx 層を最内層に加えた累積膜を作製しグルコース応答の調査を行った。Figure 9 に GOx を含む PBA-PAH/PVA 累積膜の作製過程、及び pH 7.4 緩衝溶液中での 1 mM グルコース添加時の水晶振動子マイクロバランス法測定結果を示す。共振周波数変化 (ΔF) の減少は基板上への物質の吸着、増

Fig. 10. AFM Images of GOx (PBA-PAH/PVA)₁₀ Film before (A) and after (B) Exposure to 10 mM Glucose for 60 min at pH 7.4. The images were recorded in dry state.

加は基板からの剥離を表す。はじめ、GOxの添加によって ΔF の減少がみられ水晶振動子上へのGOxの層の形成が確認できる。その後のPBA-PAHとPVAの積層操作でも同様に ΔF が減少しGOxを含むPBA-PAH/PVA累積膜が調製できていることが確認できた。ここに1 mMグルコースを添加すると ΔF の急激な増加がみられ、グルコースの添加による膜の分解応答が確認できた。GOx層と次のPBA-PAH層は静電的相互作用により結合しているため H_2O_2 により崩壊しないことを考慮するとPBAとジオールのエステル結合を駆動力としている累積膜層は完全に分解していると思われる。同様にAFM観察からも生理条件下におけるグルコースに対する膜の分解挙動を確認することができた (Fig. 10)。この累積膜の膜厚はおよそ42 nm程度であるが、グルコース処理により4 nmまで減少した。

6. おわりに

本稿で紹介したように、交互累積膜は合成高分子やタンパク質などを一層ずつ累積して薄膜あるいはカプセルとする方法で、材料の選択の幅が広く、薄膜の構造制御という点でも有用性が高い方法である。この方法により、機能性ナノ薄膜やマイクロカプセルの開発のための多彩なアイデアを実現することが可能であり今後の展開が期待できる。

謝辞 本稿で紹介した研究はすべて東北大学大学院薬学研究科で行われました。これらの研究に感謝し指導頂きました安齋順一教授に御礼申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Decher G., *Science*, **277**, 1232–1237 (1997).
- 2) Sato K., Imoto Y., Sugama J., Seki S., Inoue H., Odagiri T., Hoshi T., Anzai J., *Langmuir*, **21**, 797–799 (2005).
- 3) Inoue H., Sato K., Anzai J., *Biomacromolecules*, **6**, 27–29 (2005).
- 4) Wang Z., Feng Z., Gao C., *Chem. Mater.*, **20**, 4194–4199 (2008).
- 5) Tomita S., Sato K., Anzai J., *J. Colloid Interface Sci.*, **326**, 35–40 (2008).
- 6) Sato K., Anzai J., *Anal. Bioanal. Chem.*, **384**, 1297–1301 (2006).
- 7) Donath E., Sukhorukov G. B., Caruso F., Davis S. A., Möhwald H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **16**, 2202–2205 (1998).
- 8) Tong W., Gao C., *J. Mater. Chem.*, **18**, 3799–3812 (2008).
- 9) Mercato L. L., Ferraro M. M., Baldassarre F., Mancarella S., Greco V., Rinaldi R., Leporatti S., *Adv. Colloid Interface Sci.*, **207**, 139–154 (2014).
- 10) Sato K., Hoshina S., Anzai J., *Polym. Bull.*, **68**, 891–900 (2012).
- 11) Sato K., Anzai J., *Molecules*, **18**, 8440–8460 (2013).
- 12) Sato K., Suzuki I., Anzai J., *Langmuir*, **19**, 7406–7412 (2003).
- 13) Takahashi S., Sato K., Anzai J., *Anal. Bioanal. Chem.*, **402**, 1749–1758 (2012).
- 14) Pingarrón J. M., Yáñez-Sedeño P., González-Cortés A., *Electrochim. Acta*, **53**, 5848–5866 (2008).
- 15) Zhao W., Xu J., Chen H., *Electroanalysis*, **18**, 1737–1748 (2006).
- 16) Hashide R., Yoshida K., Hasebe Y., Takahashi S., Sato K., Anzai J., *Colloid Surf. B*, **89**, 242–247 (2012).
- 17) Sato K., Kodama D., Naka Y., Anzai J., *Biomacromolecules*, **7**, 3302–3305 (2006).
- 18) Sato K., Yoshida K., Takahashi S., Anzai J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 809–821 (2011).
- 19) Ariga K., Yamauchi Y., Rydzek G., Ji Q., Yonamine Y., Wu K. C.-W., Hill J. P., *Chem. Lett.*, **43**, 36–68 (2014).
- 20) Borges J., Mano J. F., *Chem. Rev.*, **114**, 8883–8942 (2014).
- 21) Sato K., Kodama D., Anzai J., *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 1899–1904 (2006).
- 22) Hayashida O., Hamachi I., *Chem. Lett.*, **32**, 632–633 (2003).
- 23) Ibey B. L., Beier H. T., Rounds R. M., Coté G. L., *Anal. Chem.*, **77**, 7039–7046 (2005).
- 24) Schwarz F. P., Puri K. D., Bhat R. G., Surolia A., *J. Biol. Chem.*, **268**, 7668–7677 (1993).
- 25) Mandal D. K., Kishore N., Brewer C. F., *Biochemistry*, **33**, 1149–1156 (1994).
- 26) Sato K., Kodama D., Endo Y., Anzai J., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **9**, 386–390 (2009).
- 27) Sato K., Seno M., Anzai J., *Polymers*, **6**,

- 2157–2165 (2014).
- 28) Endo Y., Sato K., Sugimoto K., Anzai J., *J. Colloid. Interf. Sci.*, **360**, 519–524 (2011).
- 29) Sato K., Nakajima T., Yasukawa Y., Anzai J., *Polym. Bull.*, **65**, 807–814 (2010).
- 30) Kawanishi T., Romey M. A., Zhu P. C., Holody M. Z., Shinkai S., *J. Fluoresc.*, **14**, 499–512 (2004).
- 31) Shibata H., Heoa Y. J., Okitsua T., Matsunaga Y., Kawanishi T., Takeuchia S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 17894–17898 (2010).
- 32) Asher S. A., Alexeev V. L., Goponenko A. V., Sharma A. C., Lednev T. K., Wilcox C. S., Finegold D. N., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3322–3329 (2003).
- 33) Watahiki R., Sato K., Suwa K., Niina S., Egawa, Y., Seki T., Anzai J., *J. Mater. Chem. B*, **2**, 5809–5817 (2014).
- 34) Springsteen G., Wang B., *Tetrahedron*, **58**, 5291–5300 (2002).
- 35) Sato K., Abe E., Takahashi M., Anzai J., *J. Colloid Interf. Sci.*, **432**, 92–97 (2014).
- 36) Dickinson B. C., Huynh C., Chang C. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 5906–5915 (2010).
- 37) Song C., Ji R., Du F., Li Z., *Macromolecules*, **46**, 8416–8425 (2013).
- 38) Broaders K. E., Grandhe S., Fréchet J. M. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 756–758 (2011).
- 39) Lux C. G., Joshi-Barr S., Nguyen T., Mahmoud E., Schopf E., Fomina N., Almutairi A., *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 15758–15764 (2012).
- 40) Sato K., Takahashi M., Ito M., Abe E., Anzai J., *Langmuir*, **30**, 9247–9250 (2014).