

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20890209  
 研究課題名（和文） 生物燃料電池を利用したインスリン放出システムの開発  
 研究課題名（英文） Development of drug delivery systems for insulin by using biofuel cell  
 研究代表者  
 高橋 成周（TAKAHASHI SHIGEHIRO）  
 奥羽大学・薬学部・講師  
 研究者番号：90511022

研究成果の概要（和文）：2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド(TEMPO)を含有する交互累積膜を作製した。作製した交互累積膜は+0.7Vの電位を印加によって膜が崩壊することがわかった。これは、TEMPOが酸化されることで正の電荷を持つため電気的な反発によって膜の崩壊が起きたと推察される。また、TEMPO含有交互累積膜にインスリンを利用することで電気応答によってインスリンが放出できることを示した。

研究成果の概要（英文）：I have successfully prepared Layer by Layer (LBL) thin films containing 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO). The LBL thin films have disintegrated at +0.7 V vs. Ag/AgCl. This result was suggested that the films collapsed due to electric repulsion because oxidized TEMPO had positive charge. Thus, it was demonstrated that insulin was released from LBL thin films by electrochemical response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：電気化学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：生物燃料電池、交互累積膜、ドラッグデリバリーシステム

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロおよびナノエレクトロメカニカルシステムを利用した薬物送達システムは必要最小限の薬物を必要な場所に、必要なときに供給することが可能なことから、薬物の過剰投与および副作用を抑制して、より安全に、効果的に薬物投与が可能となる。また、薬物投与を必要としないため、一日に複数回

注射剤の投与を強いられる患者の負担を劇的に改善することが期待できる。R. Langerらはシリコンウェーハー上に数多くの薬物貯蔵庫を作り金薄膜のアノードで貯蔵庫を密閉し、プログラムされた回路を組み込むことで電位の印加による金薄膜の溶解を自在に制御して薬物を放出する方法を提唱した(Nature 397, 335-338(1999))。現在、この

手法は *in vivo* の検討が行われており実用化へ向けて様々な検討が行われている (M. J. Cima et al., *J. Controlled Release*, 106, 138-145 (2005) など)。しかし、回路などを組み込むために必然的に装置が大きくなり外科的な手術が必要となることや、複雑なシステムを搭載しているため非常に高価といった問題がある。このため小型化可能で簡素で安価な NEMS による DDS の開発は極めて重要である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はグルコースを利用した生物燃料電池の電気応答を利用し、機能性薄膜の崩壊を制御することにより、生体内で持続的に活動可能でかつ能動的なナノエレクトロメカニカルシステム (NEMS) を構築することを目的としている。また、本法を利用することで外部からの操作を必要せず、自律的にグルコース濃度を検知してインスリンを放出するシステムを提案することにより、生活習慣病の一つである糖尿病疾患への適用について検討を行う。

## 3. 研究の方法

容易に還元が可能であり電荷が反転して負電荷を持つ物質として 2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジル-1-オキシル (TEMPO) を利用する。TEMPO のオキソアンモニウム塩の酸化還元電位はおよそ +400 mV である。生物燃料電池のカソード側の物質に酸化還元電位が +300 mV のフェリシアン酸イオンが使われていることを考慮すればカソードにおいて容易に TEMPO は還元できると推察される。本研究では TEMPO を含む交互累積膜を調整して電気化学的な膜の崩壊およびインスリンの放出制御について検討する。

## 4. 研究成果

### (1)

4-Amino-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine 1-Oxyl Free Radical (4-Amino-TEMPO) とポリアクリル酸 (PAA) (MW 1500) を DMF 溶液中で DCC を用いて脱水縮合をすることで 4-Amino-TEMPO 修飾 PAA (TEMPO-PAA) を作製した。合成物はメタノールで透析して精製した。交互累積膜の調製と崩壊の確認は水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法を用いて行った。TEMPO-PAA 溶液とポリアリルアミン (PAA) 溶液に交互に処理して金薄膜に交互累積膜を作製した (図 1)。作製した TEMPO-PAA の修飾率は元素分析によって決定したところ 37% であった。

図 2 に交互累積膜作製と電位印加による振動数変化を示した。振動数の減少から TEMPO-PAA/PAA 交互累積膜が作製できることがわかった。また、積層後、+0.7 V の電位

を印加すると振動数の増加が観察された。

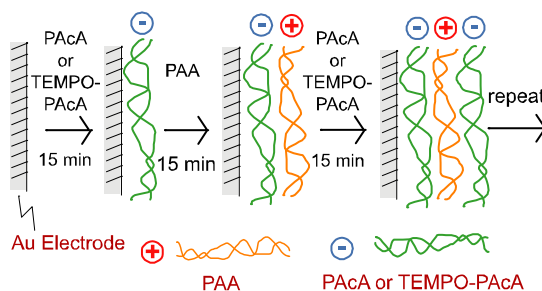


図1 PAA/PAAおよびPAA/TEMPO-PAA交互累積膜作製の模式図。

一方、PAA/PAA 交互累積膜では電位の印加によって振動数変化が見られなかった。TEMPO-PAA/PAA 交互累積膜および PAA/PAA 交互累積膜について掃引速度 50 mV/s、電位 +0.2 - +0.8 V で EQCM 法を用いて評価した。PAA/PAA 交互累積膜では QCM および CV において変化は観察されなかった (図 3)。TEMPO-PAA/PAA 交互累積膜では CV において一掃引目と二掃引目を比較すると反応に関与した電荷量が減少していることがわかった。QCM では一掃引目の +0.65 V において、共振周波数変化の減少が見られた (図 4)。TEMPO の酸化還元電位がおよそ +0.6 V であるため TEMPO が酸化されて正電荷を持ち、PAA との正電荷と静電的反発によって膜が崩壊したと推察される。

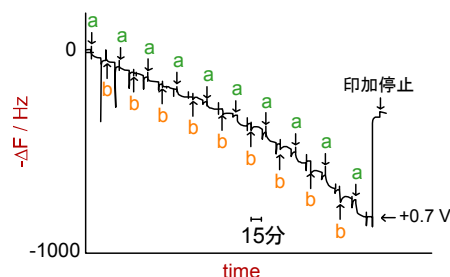


図2 (TEMPO-PAA/PAA)<sub>n</sub>/TEMPO-PAA交互累積膜の作製と電位印加による交互累積膜の崩壊の振動数変化。

a: 0.1 mg/mL TEMPO-PAA  
b: 0.1 mg/mL PAA

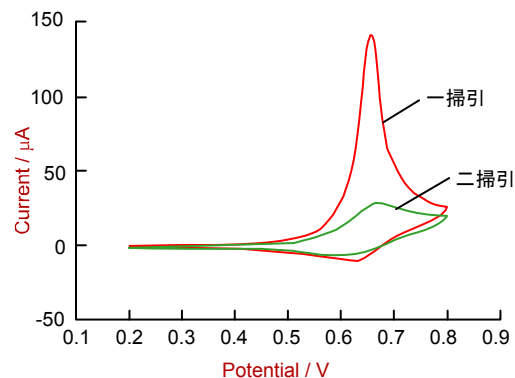


図3 (TEMPO-PAA/PAA)<sub>n</sub>/TEMPO-PAA交互累積膜のボルタモグラム。

測定溶液: 10 mM HEPES緩衝液 pH 7

100 mM KCl

掃引速度: 50 mV/s、電位: +0.2 - +0.8 V

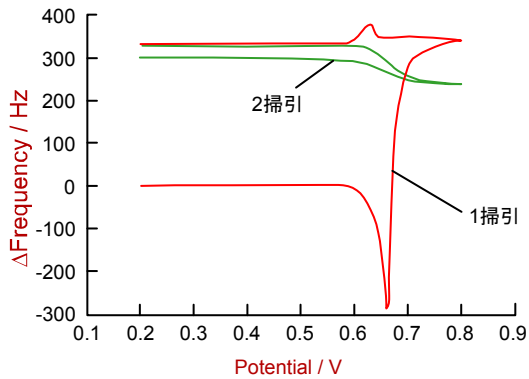


図4 (TEMPO-PAcA/PAA)<sub>9</sub>/TEMPO-PAcA交互累積膜のEQCM図。

測定溶液: 10 mM HEPES緩衝液 pH 7  
100 mM KCl  
掃引速度: 50 mV/s、電位: +0.2 - +0.8 V

(2) インスリンの等電点は 5.2 のため pH 7 で負電荷を持つ。負電荷を持つインスリンおよび TEMPO-PAcA の混合溶液と正電荷を持つポリカチオンを用いることでインスリンおよび TEMPO を含有する交互累積膜が作製できると考えられる。そこで TEMPO-PAcA およびインスリンを含む水溶液と PAA およびポリエチレンジアミン (PEI) を含む水溶液に交互に処理して金薄膜に交互累積膜を作製した。積層後、+0.7 V の電位を印加して崩壊の様子を観察した。

図 5 に TEMPO-PAcA+インスリン/PEI 交互累積膜の作製し+0.7 V の電位を印加したときの図を示した。積層操作毎に共振周波数が減少しており TEMPO-PAcA+インスリン/PEI 交互累積膜の作製ができることがわかった。また、(TEMPO-PAcA+インスリン/PEI)<sub>9</sub>/TEMPO-PAcA+インスリン交互累積膜作製後、電位を印加したとき共振周波数の増加が観察された。一方、(TEMPO-PAcA+インスリン/PAA)<sub>9</sub>/TEMPO-PAcA 膜では観察されなかった。この結果から TEMPO-PAcA および PEI 交互累積膜を使用することで電気応答によってイ

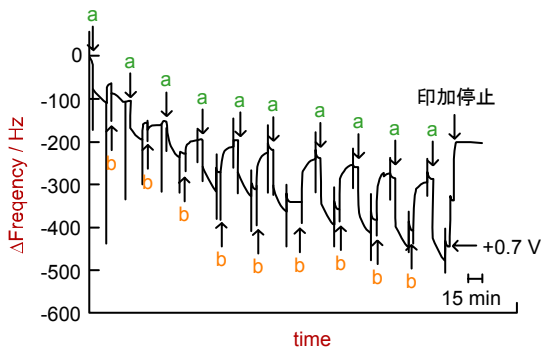


図5 (TEMPO-PAcA+Insulin/PAA)<sub>9</sub>/TEMPO-PAcA+insulin 交互累積膜の作製と電位印加による交互累積膜の崩壊の振動数変化。

a: 0.1 mg/mL TEMPO-PAcA および 0.1 mg/mL insulin  
b: 0.1 mg/mL PEI

ンスリンが放出できることが示された。  
(3) (1)および(2)の実験から電気応答によってインスリンが放出できることがわかった。しかし、(2)の実験においてインスリンの積層量のごく僅かであった。インスリンの固定化量を増やすために分子量の大きい PAcA を用いて積層量の改善を試みた。(1)と同様の手法で PAcA (MW 45000) を用いて TEMPO-PAcA を合成した。合成した TEMPO-PAcA の TEMPO の修飾率は元素分析によって決定した結果、48%であった。TEMPO-PAcA 溶液とポリカチオン溶液に交互に処理して金薄膜に交互累積膜を作製した。積層と崩壊の様子は、QCM 法、EQCM 法および CV を用いて検討した。ポリカチオンとして PAA、PEI およびポリジメチルジアリルアンモニウムクロライド (PDDA) を用いた。

TEMPO-PAcA/PAA、TEMPO-PAcA/PEI および TEMPO-PAcA/PDDA 交互累積膜の積層操作と +0.7 V を印加したときの共振周波数を図 5、図 6 および図 7 に示した。これらの結果から、TEMPO-PAcA/PEI および TEMPO-PAcA/PDDA 膜が崩壊することがわかった。一方、TEMPO-PAcA/PAA 交互累積膜は電位の印加によって膜の崩壊が観察されなかった。また、EQCM 法および CV でも同様の結果が得られた。

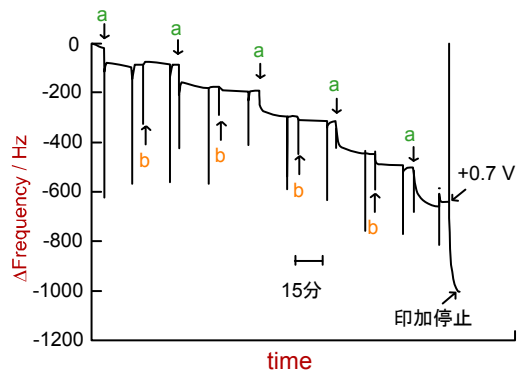


図6 (TEMPO-PAcA/PAA)<sub>9</sub>/TEMPO-PAcA交互累積膜の作製と電位印加による交互累積膜の崩壊の振動数変化。

a: 0.1 mg/mL TEMPO-PAcA  
b: 0.1 mg/mL PAA

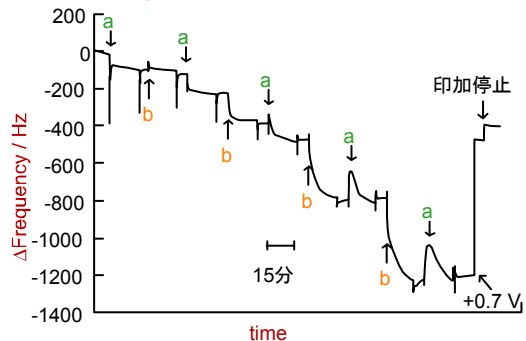


図7 (TEMPO-PAcA/PEI)<sub>9</sub>/TEMPO-PAcA交互累積膜の作製と電位印加による交互累積膜の崩壊の振動数変化。

a: 0.1 mg/mL TEMPO-PAcA  
b: 0.1 mg/mL PEI

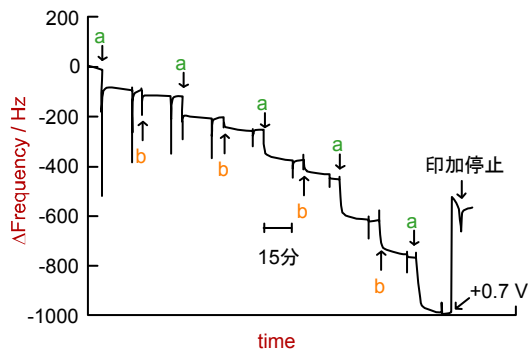


図8 (TEMPO-PAcA/PDDA)<sub>n</sub>/TEMPO-PAcA交互累積膜の作製と電位印加による交互累積膜の崩壊の振動数変化。  
a: 0.1 mg/mL TEMPO-PAcA  
b: 0.1 mg/mL PDDA

これらの結果から分子量の大きなTEMPO-PAcAを利用することで積層量を改善することがわかった。

(1)、(2)および(3)の実験結果によって電気学応答によってインスリンを放出することがわかった。交互累積膜は非常に簡便な方法でナノメートルオーダーの薄膜を作製できる。本法によって示された電気応答薄膜を利用することで安価かつ小型のインスリン放出システムへの応用が期待できる。

## 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)

[学会発表] (計3件)

- (1) 高橋成周、TEMPO 修飾ポリアクリル酸を用いた交互累積膜の電気応答による崩壊制御、2010年3月29日、岡山
- (2) 高橋成周、TEMPO 修飾高分子交互累積膜を用いたインスリン放出制御、みちのく分析科学シンポジウム、2009年7月25日、仙台
- (3) 高橋成周、電気応答によるTEMPO含有交互累積膜の崩壊制御、日本薬学会129年会、2009年3月27日、京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 成周 (TAKAHASHI SHIGEHIRO)

奥羽大学・薬学部・講師

研究者番号：90511022

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし