

機関番号：31602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790040

研究課題名（和文） 分子インプリントポリマーを用いる糖応答性インスリン放出システムの開発

研究課題名（英文） Development of glucose-sensitive Insulin Release System with Molecular Imprinting

研究代表者

小野 哲也（TETSUYA ONO）

奥羽大学・薬学部・助手

研究者番号：70433555

研究成果の概要（和文）：電解重合法を利用することで、2種類以上の機能性を併せ持つ重合膜を作製できた。また、電解重合条件を操作することで、この重合膜の性質を自由にかつ効率的に調節できることが明らかとなった。この手法を利用すれば、外部からの操作を必要とせずに自動で薬物を放出するシステムが作製可能である。

研究成果の概要（英文）：It is possible to produce the polymers that have plural functions with electrochemical polymerization. The properties of the polymers can be modulated by varying the applied polymerization potential. These results suggest that the controlled release system can be achieved with no operation from the outside.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：物理化学

## 1. 研究開始当初の背景

効果的な薬物送達システムを目指した様々な取り組みが各地で行われている中、とりわけ、マイクロおよびナノエレクトロメカニカルシステム（MEMS, NEMS）を用いたシステムが、必要な薬物を必要な部位に、必要な量だけ供給できることから注目され、実用化に向けて *in vivo* での検討まで行われている。しかし、これらの手法を用いた場合、薬物放出制御の目的で電位を印加するために回路を組み込むなど複雑なシステムが必要となるために、装置が大きくなってしまふことや多大なコストがかかることが問題点として挙げられる。

フェニルボロン酸は塩基性条件下で水酸基の付加を受けることで負電荷を形成する。また、糖類の1,2-ジオール部分と結合することでボロン酸の  $pK_a$  が低下することから、中性付近において糖濃度依存的に負電荷を持つ。分子インプリント法とは、標的分子を鋳型として重合反応液中に共存させ、その鋳型分子に選択性のある結合部位をポリマー中に構築する手法であり、鋳型分子を可逆的に取り込むことが可能である。ピロールなどの電解重合膜を利用した分子インプリントポリマーについても多数報告があり、タンパク質などの高分子をテンプレートした例もある。

しかし、これらの手法はほとんどがセンシングなどの分析分野や分子認識能力の向上に利用されており、効果的な薬物送達システムへの応用はなされていない。

## 2. 研究の目的

MEMS を用いたシステムの効果的な DDS への応用が期待されているが、まだ多くの問題点を抱えている。フェニルボロン酸や分子インプリントポリマーを利用することで、これらの課題を解決できるのではないかと考えた。すなわち、フェニルボロン酸を分子認識素子として使うのではなく糖応答による薬物放出に応用できるのではないかと考えた。フェニルボロン酸は糖のセンシングに利用されており、分子認識ではなく糖濃度変化によって薬物を放出する方法はまったく新しい手法である。また、インプリントポリマーについてもこれまで行われてきた特定物質の分子認識能力の向上に利用するのではなく、薬物および高分子生理活性物質の貯蔵庫として利用することはまったく新しい試みである。これらの手法を上記に示した MEMS に応用することで、回路を組み込む必要がなくなり、小型化への応用に一層の発展が期待できる。すなわち、この手法が確立されれば超小型の埋め込み型の薬物貯蔵庫として利用できるため、現在の医療現場において広く普及するとともに、注射剤による複数回投与の必要な患者の負担が格段に軽減されることは明白である。また、この手法を用いれば電荷を形成する薬物すべてへの応用が可能であるため、糖尿病のみならず様々な疾患治療へ応用することができる。現在、日本国内だけでも 200 万人以上の糖尿病患者がおり、予備軍まで含めればその数は 1000 万人以上にのぼる。この研究により新たな糖尿病の治療法が確立すれば、一日に複数回のインスリン投与を強いられている患者や、管理する医師の負担は劇的に改善する。また、MEMS を利用した投与方法と比較しても、装置の大きさのために外科的手術を必要としたことやコストの面が大きく改善されることは間違いない。さらにこの手法は、個人個人の状態（各患者の血中グルコース濃度）に応じて放出されるインスリン量が自動的に制御される（グルコース濃度が低ければインスリン放出量も抑制される）ため、オーダーメイド医療を指向とする現在の医療現場において広く普及し、多大な利益がもたらされることとなる。

## 3. 研究の方法

インスリンのモデル化合物として中性で負電荷を持ち紫外可視吸収を持つアスピリンを用いて電荷反発による放出について検討を行う。中性において、フェニルボロン酸

は糖と結合することによりその  $pK_a$  が低下して負電荷を形成する（図 1）。

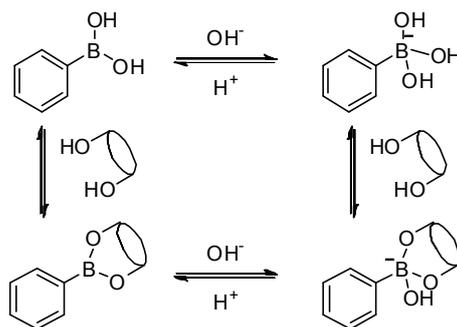


図 1

その性質を分子インプリントポリマーに組み込むためにフェニルボロン酸を側鎖に持つピロロールを合成して、ピロロール、チオフェン類の重合条件の変化による放出制御について検討する。フェニルボロン酸はグルコースと結合して負電荷を持つため、ポリピロロール膜のフェニルボロン酸の含有量、また、ポリピロロール膜の作製条件によって薬物の放出挙動は大きく変化すると思われる。このため、重合時のモノマー混合比率の操作によるボロン酸修飾率の変化や、掃引速度等の重合条件を変えて糖濃度依存的な負電荷形成量を調整することで、薬物の放出を制御できると考えられる（図 2）。

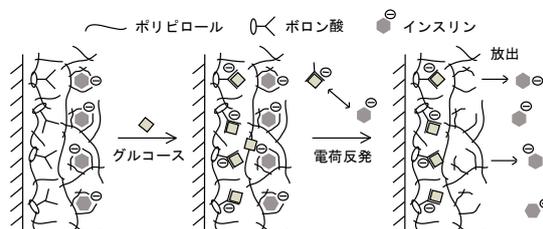


図 2 電荷の反発を利用したインスリン放出の模式図

モデル化合物を用いた薬物放出の検討は、上記のようなボロン酸含有ポリマーをモデル化合物の存在下 ITO 電極上に作製する。ITO 電極を用いた電解重合ポリピロロール膜を利用したインプリントポリマーの作成例が多数報告されているため、問題なく進行するものと思われる。そこにグルコースを添加して、電荷反発によるモデル化合物の放出量を紫外可視分光法により定量する（図 3）。

その後、高分子の生理活性物質であるインスリンの放出について検討する。タンパク質などの高分子を鋳型としたインプリントポリマーの例は報告されているが、放出前後での 3 次元構造の変化に伴う生理活性の維持が重要であるため、放出後のインスリンの構造について円偏光二色性分光法を用いて検討する。また、本薬物放出システムは酸性溶液への浸漬による糖の除去、薬物への浸漬によ

る放出薬物の再取り込みにより繰り返し利用が可能であると思われるので、再利用について検討する。

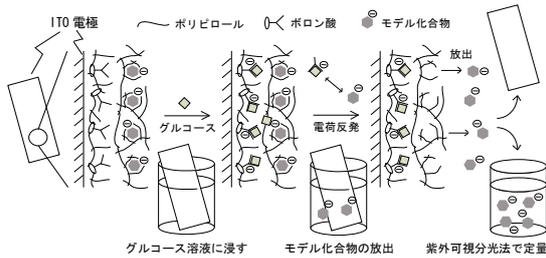


図3 電荷の反発を利用したモデル化合物放出の確認方法

#### 4. 研究成果

電解重合膜の作製条件について、サイクリックボルタンメトリー (CV) を用いて詳細な検討を行った。薬物放出を担うフェニルボロン酸の固定化量の制御について検討を行ったが、重合膜中のその含有率を直接求めることが困難であったことから、代わりに電気化学的活性を有するニトロキシラジカル化合物をピロールに連結し、電解重合条件によって変化する置換基の含有率を CV を用いて評価した。その結果、重合時の掃引速度、掃引回数などを操作することにより、機能性物質の含有量を自由に制御できることが明らかとなった (図4)。

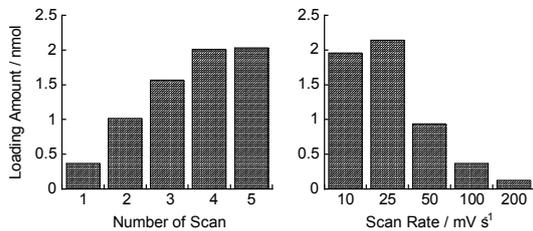


図4 掃引速度および掃引回数の変化に伴う固定化量の変化

定電位電解による電解重合膜の作製も可能で、電解時間を調節することにより、膜厚や固定化量を制御できた (図5)。

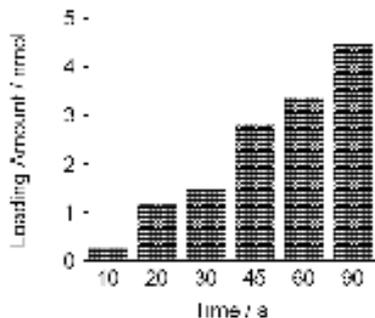


図5 定電位の電解時間による固定化量の変化

さらに、ピロール誘導体のみで電解重合を行うよりも、ピチオフェン、ターチオフェンを共存させて共重合膜を作製するほうが、置換基導入効率が向上することが明らかとなり、それらの混合比率を変化させることによって、導入量も制御可能であることが明らかとなった (図6)。

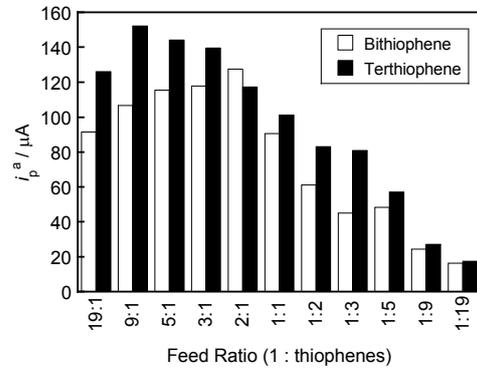


図6 チオフェン類との混合比率の変化に伴う固定化量の変化

これらの結果から、電解重合膜そのものの固定化量や厚さ、および薬物の放出を担うフェニルボロン酸の固定化量それぞれを、種々の電解重合条件を任意に操作することにより自由に制御できることが明らかとなった。これを利用することにより、インスリンの膜中への貯蔵量および糖濃度依存的なインスリンの放出量を様々なオーダーで制御できることが示唆された。

次に、薬物モデル化合物の重合膜への取り込みと、糖濃度依存的な放出について検討を行った。はじめに、電解重合可能な 1-(3-ヒドロキシプロピル)ピロールと糖濃度依存的に負電荷を形成する 4-カルボキシフェニルボロン酸をエステル結合により連結し、重合単量体を得た。この単量体と 2,2'-ピチオフェンを、薬物モデル化合物であるアスピリンの存在下、サイクリックボルタンメトリーを用いて電解共重合し、薬物貯蔵膜を作製した。次に、この重合膜をグルコース水溶液に浸漬し、糖濃度依存的な負電荷形成によるアスピリンの放出について検討し、紫外可視分光光度法によりアスピリンの放出量を調べた。種々の電解条件や糖濃度条件でこれらの検討を行ったが、最終的にグルコース溶液中へのアスピリンの放出を確認することができなかった。これまでの研究結果から、共重合膜中のモノマーの組成を自由に制御できることは明らかではあるが、電気化学的活性を持たないフェニルボロン酸の重合膜中への取り込み比率を正確に把握することが困難であった。また、アスピリンの放出に至らなかった原因として考えられるのが、溶媒条件であると思われる。重合は有機溶媒中で行ったが、放出検討は水溶媒中で行うため、溶媒

の変化によって重合膜が何らかの構造変化を起し、予想された放出機構が機能しなかったものと思われる。

これらの結果から、水溶液中での薬物貯蔵分子インプリントポリマーの作製や、電気化学的手法、紫外可視分光光度法に因らない重合膜や薬物放出の評価法について、現在さらなる検討を行っている。

## 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)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Voltammetric Behavior of Mediator Modified Electrode by Electrochemical Polymerization of Nitroxyl Radical Precursor Containing Pyrrole Side Chain, Tetsuya Ono, Makiko Tsunoda, Shigehiro Takahashi, Toshio Obata, Takanori Sone and Yoshitomo Kashiwagi, Heterocycles, 査読有, Vol. 81, No. 12, 2010, pp. 2771-2780.

[学会発表] (計3件)

- ① 小野哲也、高森由美子、曾根孝範、柏木良友、電解重合法により作製したニトロキシラジカル置換ピロール固定化電極を用いたアミン類の電解触媒酸化反応、第40回複素環化学討論会、2010年10月14日、仙台市民会館

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野 哲也 (TETSUYA ONO)

奥羽大学・薬学部・助手

研究者番号：70433555