

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460030

研究課題名(和文)電気応答 dendrimer を用いた薬物放出システムの開発

研究課題名(英文) Development of drug delivery system by using layer by layer thin films composed of electroactive moieties modified-dendrimer

研究代表者

高橋 成周 (Takahashi, Shigehiro)

高崎健康福祉大学・薬学部・講師

研究者番号：90511022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：フェロセン単分子膜修飾電極に吸着した非イオン性高分子を電気化学応答によって放出できることが示された。また、色素含有 dendrimer 混合溶液とアニオン性高分子を用いて色素内包 dendrimer 交互累積膜を作製できることがわかった。色素内包 dendrimer 交互累積膜を用いることで、積層数が増やすことで取り込まれた色素の放出速度を抑制できることがわかった。本法を用いることで積層操作数を調節することで膜内部からの化合物の放出速度を任意に制御できる可能性が示唆された。これらの方法を組み合わせることで電気応答と放出速度を制御した薬物放出システムへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated electrochemical release of nonionic polymer using 6-ferrocenylhexanethiol self assembled monolayer-modified (Fc-SAM) electrode. This result suggests a variety of nonionic polymers can be released on the electrode by electrochemical reaction. Layer by Layer (LbL) films composed of PAMAM dendrimer containing dye were prepared successfully. Release of dye was suppressed as the number of layer increased. Release rate of compounds in the films may be regulated by the number of layer. These results are useful for electrochemical drug delivery system and controlled-release membrane.

研究分野：機能性薄膜

キーワード：電気化学 dendrimer DDS

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(NEMS)を利用した薬物送達システムは必要最小限の薬物を適切な場所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、より安全かつ効果的な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。これまで報告された組み込み型のマイクロチップを用いた DDS は、M.Chao ら(Lab Chip, 2011, 11, 3072-3080)や P. Y. Li ら(J. Microelectromech. sys., 2009, 18, 6)などが報告されている。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に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かつ安価な NEMS による DDS の開発は極めて重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究は、電気応答 dendrimer を利用することで、電位変化により薬物放出を制御するマイクロエレクトロメカニカルシステム(MEMS)を構築することを目的としている。さらに、複数の電気応答 dendrimer を基板表面に固定化することで、多段階の電気刺激に応答して薬物放出するシステムを構築する。本研究を利用することで、即効性と徐放性を兼ね備えた次世代の薬物放出システムの構築を目指す。

3. 研究の方法

4-アミノ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジル-1-オキシル(4-amino-TEMPO)をジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)でカルボン酸を持つポリアミドアミン dendrimer (PAMAM)に脱水縮合して TEMPO 修飾 PAMAM(TEMPO-PAMAM)を合成する。その後、正電荷を持つポリアリルアミン(PAA)およびポリエチレンジアミン(PEI)などのポリカチオンと負電荷を持つ TEMPO-PAMAM を用いて交互累積膜を作製する。作製した交互累積膜修飾電極に+0.7 V の電位を印加して膜の崩壊特性について検討を行った。

電気応答による高分子を放出する手法として、フェロセン単分子膜(Fc-SAM)を利用する方法について検討を行った。ピラニア溶液で清浄化した金電極を 6-フェロセニルヘキサチオール溶液に浸して、フェロセン単分子膜(Fc-SAM)修飾電極を作製した。作製した Fc-SAM への高分子の吸着および電位印加における脱着を水晶振動子マイクロバランス法で評価した。

これらの電気応答による高分子の放出システムの開発と平行して、dendrimer 交互累積膜の作製と取り込まれた色素の放出機構について検討した。薬物のモデル化合物には、dendrimer 内部に包摂される物質とし

て研究が用いられているローズベンガル(RB)を用いた。RB と PAMAM 混合溶液とポリビニル硫酸(PVS)の交互累積膜を作製して、膜内に取り込まれた色素の総量および色素の放出挙動について紫外可視分光法を用いて評価した。

4. 研究成果

平成 26 年度および平成 27 年度は 4-amino-TEMPO の PAMAM への修飾することで電気応答 dendrimer を合成して、電気応答 dendrimer 交互累積膜の作製とその崩壊特性について検討した。作製した TEMPO-PAMAM と正電荷を持つ PEI を用いて PEI/TEMPO-PAMAM 交互後累積膜を用いて作製した。その後、作製した電極に+0.7 V の電位を印加して電解前後の崩壊率を水晶振動子マイクロバランス法で評価した。しかし、電気応答による膜の崩壊はほとんど見られなかった。これは TEMPO の修飾率が 0.1% と極めて低いためと推察される。様々な合成方法で、修飾率の向上を目指したが 0.1% 以上の修飾率を得ることができなかった。この結果、TEMPO-PAMAM を使用しない方法による電気応答による薬物放出システムの開発について検討を行った。

電気応答による薬物放出において高い放出率を得るために、電極表面に吸着した高分子を円滑に脱着することが重要である。そこで、電極表面の状態を電気化学的に制御することによって吸着した高分子の放出について検討を行った。フェロセンは電気化学活性を持ち、酸化されると電荷を持つことで錯体を形成することが知られている。フェロセン単分子膜上ではフェロセンが電気化学的に酸化されることで、正電荷を持つ。結果として、電極表面の疎水性が大きく低下すると考えられる。本研究では、フェロセン単分子膜上にポリビニルアルコール(PVA)を固定化して電気応答による脱着について検討を行った。Fig.1 は、Fc-SAM 修飾電極への PVA 溶液で処理を行って+0.6 V の電位印加を行ったときの水晶振動子マイクロバランス法における周波数変化を示している。

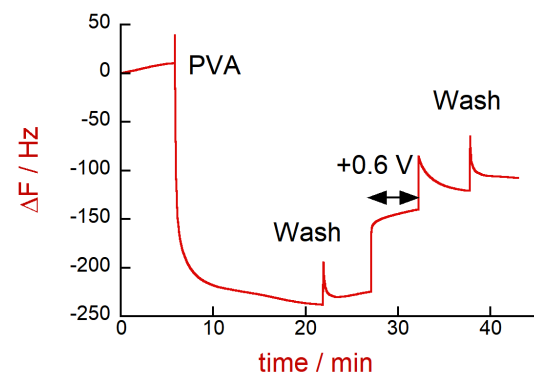


Fig.1 Fc-SAM 修飾電極における PVA の吸着および電位印加したときの共振周波数変化

Fc-SAM 修飾金薄膜水晶振動子を PVA 溶液で

15 分間処理すると 315 ng の吸着が観察された。HEPES 緩衝液で洗浄を行った後、+0.6 V で 5 分間の電位印加を行った後に、Fc-SAM 上に残っている PVA は 157 ng であった。この結果から、およそ 50% の PVA が電位の印加によって Fc-SAM 上から脱着することがわかった。また、電気化学的手法による PVA の脱着について検討を行った。Fig.2 は Fc-SAM、PVA 吸着後および電解後のヘキサアンミンルテニウムクロリドのボルタモグラムを示している。

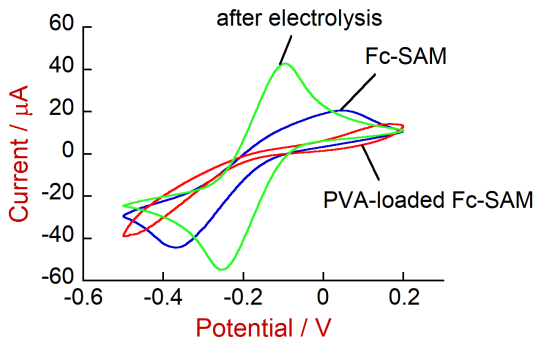
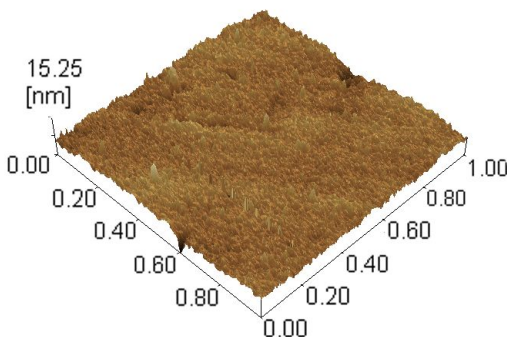


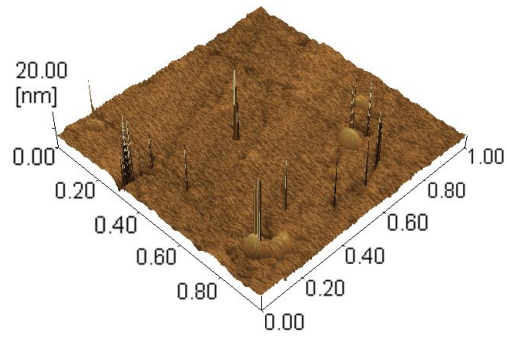
Fig.2 Fc-SAM、PVA 固定化 Fc-SAM および電位印加後 PVA 固定化 Fc-SAM 修飾電極のヘキサアンミンルテニウムクロリドの CV 図

Fc-SAM 修飾電極と比較して PVA 固定化 Fc-SAM 修飾電極ではルテニウム錯体イオンの酸化還元が大きく抑制されることがわかった。これは PVA の吸着によってルテニウム錯体イオンの電子授受が抑制されたためと考えられる。PVA 固定化 Fc-SAM 修飾電極に +0.6 V の電位を 5 分間印加するとルテニウム錯体の電気化学応答が大きく増加した。この結果より、Fc-SAM 上に固定化されていた PVA が脱着してルテニウム錯体の電子授受が改善したことが示唆された。Fc-SAM 修飾電極、PVA 固定化 Fc-SAM 修飾電極および電位印加後の PVA 固定化 Fc-SAM 修飾電極の表面状態を調べるために原子間力顕微鏡で観察を行った(Fig.3)。RMS roughness factor は Fc-SAM 修飾電極、PVA 固定化 Fc-SAM 修飾電極および電位印加後の PVA 固定化 Fc-SAM 修飾電極において、それぞれ 1.4、3.3 および 4.7 nm であった。電解後に粗さが増加したのは電解によって一部の PVA が脱着したためと推察される。

a) Fc-SAM



b)PVA 固定化 Fc-SAM



c)電位印加後の PVA 固定化 Fc-SAM 修飾電極

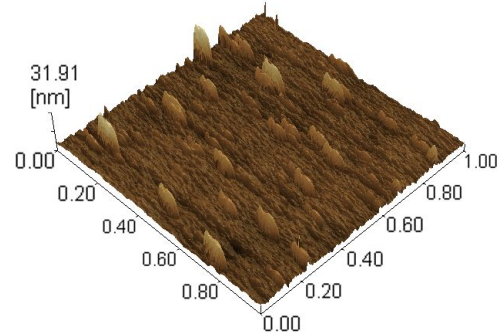


Fig.3 Fc-SAM(a)、PVA 固定化 Fc-SAM(b)および電位印加後の PVA 固定化 Fc-SAM 修飾電極(c)の AFM 画像

電気応答による高分子を放出するシステムに関する研究の他に、 dendrimer を高密度で集積し内部に取り込まれた化合物の放出制御について検討した。 dendrimer は球状の高分子化合物で内部に空隙を持ち疎水性化合物を取り込むことが知られている。しかし、取り込まれた化合物は時間とともに容易に溶出するため、溶出を抑制して任意のタイミングで薬物を放出するシステム構築することは重要な課題である。本研究では dendrimer と交互累積膜を組み合わせることで dendrimer 内部に格納された化合物の溶出を制御することを試みた。

PAMAM に格納された化合物の放出機序を調べるモデル化合物としてローズベンガル (RB) を用いた。 RB は PAMAM の空隙に取り込まれて、高いモル吸光係数を示すことが知られている。 RB および PAMAM 混合溶液と PVS 溶液に交互に浸すことで RB-PAMAM/PVS 交互累積膜を作製した。 Fig.4 は PEI/(PVS/RB-PAMAM)_n 交互累積膜の紫外可視吸収スペクトルを示している。積層数の増加に伴って 270 nm および 550 nm の吸光度の増加が確認された。これは膜内に取り込まれた RB に由来すると考えられる。 6.9 µM RB 水溶液と PEI/(PVS/PAMAM)₅ 交互累積膜のスペクトルを比較すると PAMAM に取り込まれることで大きく変化することがわかった(Fig.2)。これは PAMAM 内部が疎水性であるため RB のスペクトルが変化したと考えら

れる。これらの結果から RB 含有 PAMAM 交互累積膜が作製できることがわかった。

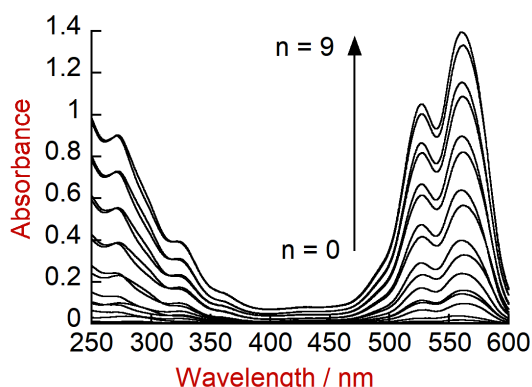


Fig.4 PEI/(RB-PAMAM/PVS)_n 交互累積膜の紫外可視吸収スペクトル

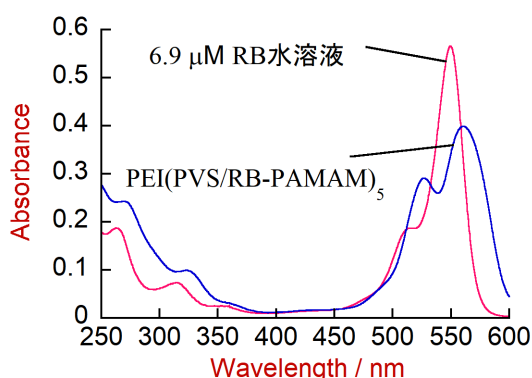


Fig.5 6.9 μM RB 水溶液および PEI/(PVS/RB-PAMAM)₅ 交互累積膜の紫外可視吸収スペクトル

PEI/(PVS/RB-PAMAM)_n における RB の放出挙動を調べるために、作製した PVS/PAMAM 交互累積膜を被覆した石英板を 20 mL の 10 mM HEPES (100 mM KCl, pH 7.0) 溶液に浸して、一時間毎に吸光度を測定した。Fig.6 は各積層数における放出率の経時変化を示している。積層数が増加するにつれて放出速度が遅くなることがわかった。また、RB の放出は一定速度で放出されて、3 層、5 層

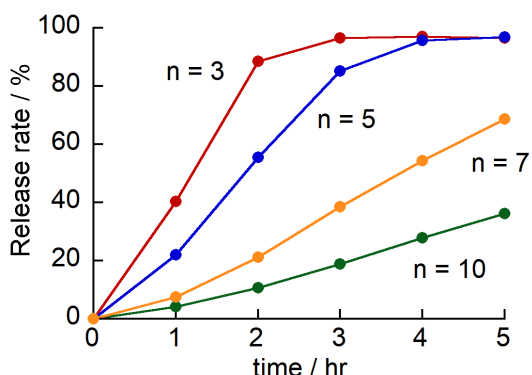


Fig.6 PEI/(PVS/RB-PAMAM)_n における放出率の経時変化
7 層、10 層でそれぞれ 1.37 nmol/hr、9.20 nmol/hr、8.24 nmol/hr、5.75 nmol/hr であった。

3 層における放出速度が他の層数と比較して小さい結果となった。これは RB の固定化量が少ないためと考えられる。一方、5 層以降において積層数が増加すると放出速度が抑制されることが示唆された。この結果から RB-PAMAM 交互累積膜の総数を変えることで RB の放出挙動を制御できることが示された。

本研究によって明らかになった Fc-SAM による高分子の放出と薬物含有 PAMAM 交互累積膜を組み合わせることで任意のタイミングで薬物を放出する電気化学を利用した薬物放出システムへの応用が期待される。

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 11 件)

1. 高橋成周、尾崎康嗣、上條利夫、森永隆志、佐藤貴哉、鈴木巖、イオン液体固定化電極の過酸化水素応答、日本薬学会 137 年会、2017 年 3 月 10 日(仙台)

2. 小野雅貴、高橋成周、細井麻美子、鈴木巖、フルオレセイン型色素包接 dendrimer 交互累積膜の調製とイオン強度の影響、過酸化水素応答、日本薬学会 137 年会、2017 年 3 月 10 日(仙台)

3. 笹森将也、高橋成周、安斉順一、Dendrimer 交互累積膜を用いたローズベンガルの放出制御、日本薬学会 136 年会、2016 年 3 月 27 日(横浜)

4. 高橋成周、清水星来、安斉順一、フェロセン単分子膜修飾電極を用いた電気化学応答による脱吸着挙動、日本薬学会 136 年会、2016 年 3 月 27 日(横浜)

5. Shigehiro TAKAHASHI、Seira Shimizu、Jun-ichi ANZAI、Electrochemically controlled release of polymer from 6-ferrocenylhexanethiol monolayer modified electrode、Pacifichem、2015 年 12 月 18 日(Hawaii, USA)

6. 高橋成周、新規な機能性電極の開発とバイオセンサーへの応用、第 35 回東北薬学セミナー、2015 年 12 月 12 日(仙台)

7. 清水星来、高橋成周、安斉順一、非イオン性高分子のフェロセン自己組織化単分子膜修飾電極に対する吸着および電位変化による放出制御、2015 年 9 月 26 日(盛岡)

8. 笹森将也、高橋成周、安斉順一、ローズベンガル内包 dendrimer 交互累積膜の調製、第 55 回日本薬学会東北支部大会、2015 年 9 月 26 日(盛岡)

9. 遠藤真祐美、高橋成周、安斉順一、デンドリマー交互累積膜のアリザリンレッドSの取り込みと放出、第55回日本薬学会東北支部大会、2015年9月26日(盛岡)

10. 高橋成周、清水星来、安斉順一、フェロセン自己組織化単分子膜を用いた電気応答による高分子の放出制御、日本薬学会第135年会、2015年3月28日(神戸)

11. 清水星来、高橋成周、安斉順一、フェロセン自己組織化単分子膜を用いた電気応答による非イオン性高分子の放出制御、第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日(いわき)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 成周 (TAKAHASHI, SHIGEHIRO)

高崎健康福祉大学・薬学部・講師

研究者番号：90511022