

コンビネーション化学療法における多剤内包スマート ポリマー材料を用いた放出制御方法論

菅生 健

2019 年 7 月

筑波大学大学院博士課程

数理物質科学研究科博士論文

博士（工学）

コンビネーション化学療法における多剤内包スマート
ポリマー材料を用いた放出制御方法論

菅生 健

物質・材料工学専攻

目次

第 1 章	1
1.1. 抗菌薬と耐性菌	2
1.2. 薬剤耐性のメカニズム	3
1.2.1. 細菌自身による防衛反応	3
1.2.1.1. 薬剤の不活化	3
1.2.1.2. 作用点の変異	4
1.2.1.3. 薬剤の排出	4
1.2.1.4. 透過性の低下	4
1.2.1.5. バイオフィルムの形成	4
1.2.1.6. 獲得性 (外因性) の耐性機構	4
1.2.2. 人為的な耐性の誘導	5
1.3. 薬剤投与の理想と現実とフレミングの予言	6
1.4. 耐性菌等難治性感染対策	7
1.4.1. 新薬開発	7
1.4.2. 投与方法 (抗菌薬ローテーション)	7
1.4.3. 多剤併用療法という試み	8
1.4.4. ドラッグデリバリーシステム (DDS)	9
1.4.5. コンビネーションプロダクト	9
1.5. 本論文の主題と構成	10
1.5.1. 本論文の主題	10
1.5.2. 本論文の構成	10
1.6 参考文献	11
第2章	14
2.1. 諸言	15
2.1.1. リン酸カルシウム骨ペースト (CPC)	15
2.1.2. 抗菌薬との併用	15
2.1.3. 多剤内包 CPC	16
2.2. 実験	17
2.2.1. 試薬	17
2.2.2. 試験方法	18
2.2.3. PBS 調製方法	19
2.2.4. VCM の分析方法	20
2.2.4.1. 移動相の調製	20
2.2.4.2. HPLC 条件	20
2.2.5. GM の分析方法	20
2.2.5.1. ストラテジー	20
2.2.5.2. 移動相の調製	20
2.2.5.3. OPA 溶液の調製	20
2.2.5.4. HPLC 条件	21
2.3. 結果	21
2.4. 検証と考察	22
2.4.1. 薬剤－薬剤間相互作用	22

2.4.2. 薬剤－材料間相互作用	23
2.4.3. X 線回折分析 (XRD)	24
2.4.4. 気孔径の変化	25
2.4.5. 薬剤による傾向検証	26
2.4.6. 気孔構造と薬物放出の相関	26
2.4.7. 力学的強度への影響	29
2.4.8. 粉末抗菌薬の挙動	30
2.5. 第2章のまとめ	31
2.6. 参考文献	32
第3章	35
3.1. 諸言	36
3.1.1. PCL に着目した経緯	36
3.1.2. 生分解性ポリマー	37
3.1.3. ドラッグデリバリーシステム分野 (DDS)での応用	37
3.1.4. スマートポリマーを用いた化学療法	38
3.1.4.1. PCL	38
3.1.4.2. 内包する抗がん剤	40
3.1.5. TC 療法について	41
3.2. PCL スマートフィルムの作製	43
3.2.1. 実験	43
3.2.1.1. 試薬	43
3.2.1.2. PCL の合成	45
3.2.1.3. PCL マクロモノマー化	45
3.2.1.4. PCL フィルムの合成	45
3.2.2. 結果と考察	46
3.2.2.1. PCL の構造評価	46
3.2.2.2. PCL-m の構造評価	47
3.3. PCL フィルムの物性評価	48
3.3.1. 融点検証	48
3.3.1.1. 実験	48
3.3.1.2. 結果と考察	48
3.4. 薬物放出試験	49
3.4.1. 薬剤分析方法	49
3.4.1.1. 吸光光度法	49
3.4.1.2. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)法	49
3.4.2. In vitro 薬物放出試験	51
3.4.3. 結果と考察	52
3.4.3.1. 薬剤分析方法	52
3.4.3.2. In vitro 薬物放出試験	53
3.4.3.2.1. PTX の測定結果	53
3.4.3.2.2. CBDCA の測定結果	53
3.4.3.3. 信頼区間	55
3.4.3.4. 結晶化度	55
3.5. 相互作用検証	56
3.5.1. 薬剤－薬剤間相互作用	56

3.5.2. 薬剤－材料間相互作用	57
3.6. 第3章のまとめ	58
3.7. 参考文献	58
第4章	63
4.1. 諸言	64
4.1.1. MNPs－PCL 複合化の意義	64
4.1.2. MNPs	65
4.2. 実験	66
4.2.1. 試薬	66
4.2.2. MNPs－PCL 複合化フィルムの作製	68
4.2.3. 熱分析	68
4.2.3.1. 実験	68
4.2.3.2. 結果と考察	69
4.2.4. 発熱挙動	69
4.2.4.1. 実験	69
4.2.4.2. 結果と考察	69
4.2.5. 融点検証	71
4.2.5.1. 実験	71
4.2.5.2. 結果と考察	71
4.2.6. In vitro 薬物放出試験	72
4.2.6.1. パクリタキセル (PTX)の測定結果	72
4.2.6.2. 温熱刺激により PTX の溶出が減少する事象について	73
4.2.6.2.1. PTX の透過性	73
4.2.6.2.2. 接触角	74
4.2.6.2.3. アレニウスプロット	74
4.2.6.2.4. 分配係数検証	75
4.2.6.3. カルボプラチン (CBDCA)の測定結果	77
4.2.6.4. MNPs 添加により CBDCA の溶出が減少する事象について	77
4.2.6.4.1. 再現実験	77
4.2.6.4.2. フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)	78
4.2.6.4.3. 相互作用メカニズムの検証	79
4.3. 第4章のまとめ	81
4.4. 効果的な材料設計への提言	82
4.5. 敢えて One-pot 型にしないという選択肢	83
4.6. 参考文献	84
第5章	87
【発表リスト】	89
【発表論文 (Proceedings 含む)】	89
【早期修了プログラム審査要件】	89
【謝辞】	90

第 1 章

本研究の背景

1.1. 抗菌薬と耐性菌

近代医学史上もっとも偉大な革命といえ、間違いなくそのひとつに数えられるのが抗菌薬の発見であろう。ペスト、チフス、コレラ、破傷風などの感染症が蔓延した時代、抗菌薬は戦後の人類の復興を支えてきたと言っても過言ではない。世界で初めて発見された抗菌薬は、1928年アレクサンダー・フレミングによるアオカビ由来のペニシリンである¹。それ以前は、一部の合成抗菌薬、および石炭酸や鼻汁中のリゾチームに消毒・殺菌作用があることが知られてはいたが、人体への悪影響や高病原菌には作用しないなど予防的効果に過ぎず、化膿してしまった傷口を治療できるペニシリンはまさに、「奇跡の薬」や「魔法の弾丸」などと称された²。ペニシリンは、細菌の細胞壁主成分であるペプチドグリカンの合成に関与する酵素を選択的に阻害することで、菌の増殖のみを抑えることができた³。このように、人体にはほとんど影響を与えず、細菌のみを攻撃できることが、ペニシリンをはじめ、その後の抗菌薬が爆発的にヒットした大きな理由であり、今現在でも抗菌薬がなければ、感染症の治療は難しく重症化しやすくなり、死に至るケースもあると考えられる。

その後ペニシリンは、ハワード・フローリー、エルンスト・チェインによって高濃度精製され、1943年（出典により諸説あり）に上市された後は、第二次世界大戦で傷ついた多くの兵士を救った。フレミング、フローリー、チェインはその功績が認められ、1945年ノーベル医学生理学賞を受賞し、抗菌薬という武器を得た人類の未来は明るいものであるように思われた。しかしながら、Fig. 1-1は、ペニシリン以降発売された代表的な抗菌薬と、それらに耐性を示す細菌の出現の歴史を年表で表したものである。

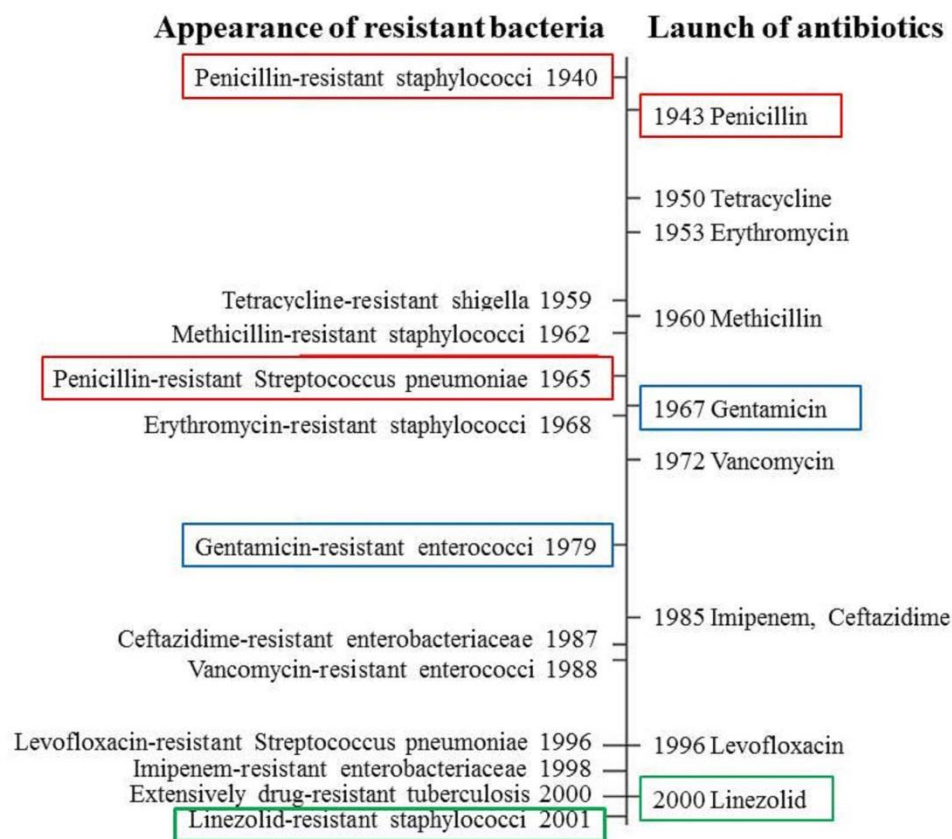


Fig. 1-1 Relationship between antibiotic development and appearance of resistant bacteria⁴.

これによると、フレミングがペニシリン (赤枠)を発見してから 12 年後の 1940 年、ペニシリンに耐性を示すブドウ球菌が既に発見されている。さらに発売から 22 年経過した 1965 年には、ペニシリン耐性肺炎球菌が認められた。また例えば、1967 年に発売されたゲンタマイシン (青枠)に関しても、12 年後の 1979 年にゲンタマイシン耐性腸球菌が発見され、近年 MRSA 感染症の最終兵器と呼ばれたリネゾリド (緑枠)に関しては、2000 年の発売からわずか 1 年後に、リネゾリド耐性ブドウ球菌が出現した。このように、抗菌薬の開発と耐性菌の出現はイタチごっこの関係にあり、戦後のめざましい抗菌薬開発の裏には、常に薬剤耐性との戦いの歴史が存在したことを強く示している。そしてそれは今現在でも、世界的規模の社会問題として人類の脅威となっているのである。

1.2. 薬剤耐性のメカニズム

耐性菌と言っても、諸外国に比べて本邦では、まだまだその脅威は身近ではない。そこで、米国における耐性菌の年間推定患者数と死亡者数を Table 1-1 に示す⁴。これによると、耐性菌による感染症が原因で年間 2 万人以上が死亡しているとの推定結果が報告されており、抗菌薬が効かないということの恐ろしさを感じることができる。今後これらの耐性菌を渡航者らが持ち込む可能性も十分考えられ、遠い海外での出来事と楽観視することはできない。

Table 1-1 Estimated annual number of patients and deaths of various resistant bacteria in the United States

Resistant bacteria	The estimated number of patients	The estimated number of deaths
MRSA	80,000	11,000
Resistant pneumococcus	1,200,000	7,000
ESBL producing bacteria	26,000	1,700
VRE	20,000	1,300
CRE	9,300	610
Multidrug-resistant Acinetobacter	7,300	500
MDRP	6,700	440
MRSA: Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>		
ESBL: Extended spectrum β -lactamases		
VRE: Vancomycin-resistant enterococci		
CRE: Carbapenem-resistant enterobacteriaceae		
MDRP: Multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

そもそもなぜ耐性菌が出現するのだろうか。薬剤耐性化のメカニズムは様々報告されているが、おもに内因性と外因性に大別される⁵。前者は、細菌が本来保有している内在性の遺伝子による耐性、一方で後者は、外部からの耐性遺伝子の獲得と言い換えることができる。また、これらは細菌自身による防衛反応であるのに対し、人為的に耐性を誘導してしまうケースが社会問題と化している。以下に各耐性機構の詳細を示す。

1.2.1. 細菌自身による防衛反応

1.2.1.1. 薬剤の不活化⁶

細菌自身が薬剤を化学的に修飾や分解する酵素（主にペニシリナーゼ、 β -ラクタマーゼなど）を作り出すことで、細菌が耐性を獲得する (Fig. 1-2 ①)。

1.2.1.2. 作用点の変異

一般的に薬は、細菌の特定の部位に特異的に作用することが知られているが、その標的とする細菌の部位の構造を変化することで薬剤は攻撃できなくなり、効果は得られなくなる (Fig. 1-2 ②)。

1.2.1.3. 薬剤の排出

菌体内に浸透した抗菌剤や殺菌物質は、ATP を使った能動輸送ポンプによって体外に排出される (Fig. 1-2 ③)。

1.2.1.4. 透過性の低下⁷

細胞外膜には、外部から栄養素を取り込むポーリンと呼ばれる孔が存在するが、耐性菌はこの外膜を変化させてポーリンの数を減らし、抗菌薬が菌体内に浸透するのを阻害する (Fig. 1-2 ④)。

1.2.1.5. バイオフィルムの形成⁸

ブドウ球菌などの細菌が産生する多糖類と生体内のフィブリンなどが反応してマトリックスを形成し、バイオフィルムと呼ばれる細菌の巣またはバリアのようなものが構築される。バイオフィルムは、すべての抗菌薬の作用や宿主の免疫機構に耐性を示し無効化する (Fig. 1-2 ⑤)。

1.2.1.6. 獲得性 (外因性)の耐性機構⁹

耐性菌の耐性遺伝子が、耐性を持たない細菌に接合やファージによって導入され、耐性を獲得する。このような耐性の伝達を繰り返すことで変異が起こりやすく、膨大な種類の耐性菌が発生する危険性がある。

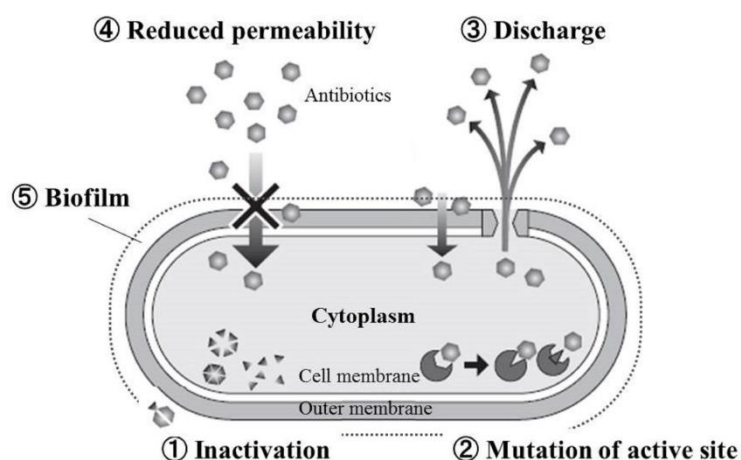


Fig. 1-2 Schematic illustration of the drug resistance mechanism¹⁰

1.2.2. 人為的な耐性の誘導

2016 年の G7 伊勢志摩サミットにおいて「薬剤耐性対策」が協議された。この中で、日本が策定した「薬剤耐性対策アクションプラン 2016-2020」において、「抗菌薬の使用量を 2013 年水準の 3 分の 2 に減らす」ことが成果指標の一つとして掲げられた¹¹。薬が効かずに生き延びる細菌が問題視されている中で、抗菌薬の効果を上げるために使用量を増やすのではなく、減らすとはどういうことを意味するのだろうか。その背景には、「抗菌薬の適正使用」という考え方があり、低濃度投与、投与の中断、長期投与がいずれも不適切な使用、乱用と見なされている。

上記セクション 1.2.1 で述べたように、耐性菌はあらゆる防衛反応を行うためにそのエネルギーを消費しなければならない。したがって、様々な菌種がバランスを保って存在し合うとき、それら耐性遺伝子を持った菌群は、比較的細々と生きているマイノリティーである。しかしながら、もしそこに中途半端な抗菌薬投与が行われた場合、感受性菌は駆逐されるものの、耐性菌は生き残るという事態が発生する (Fig. 1-3)¹²。これを、「選択圧 (Antibiotic pressure)がかかる」と呼び、また同時に、駆逐された感受性菌のスペース、つまり、耐性菌が増殖するスペースを、不十分な抗菌薬投与によって人為的に作ってしまったことを意味する。さらに負の連鎖は続き、効果が得られないという判断で別の抗菌薬を同様に投与してしまうと、その抗菌薬に対する耐性菌もまた勢力を増してくるであろう。これらの行為を繰り返すことで、終にはあらゆる抗菌薬が効かない多剤耐性菌に支配された身体が完成してしまい、その予後は想像に難くない。

また、上記で述べたアクションプラン「使用量を減らす」に関しては、馴化を避けるために 1 種類の薬剤を長期投与すべきではないことも意味しており、1 回の投与量を減らすことではない。一般的には、複数の薬剤を短期間分散投与するのが理想とされているが、具体的な取り組みに関しては、セクション 1.4 で述べる。

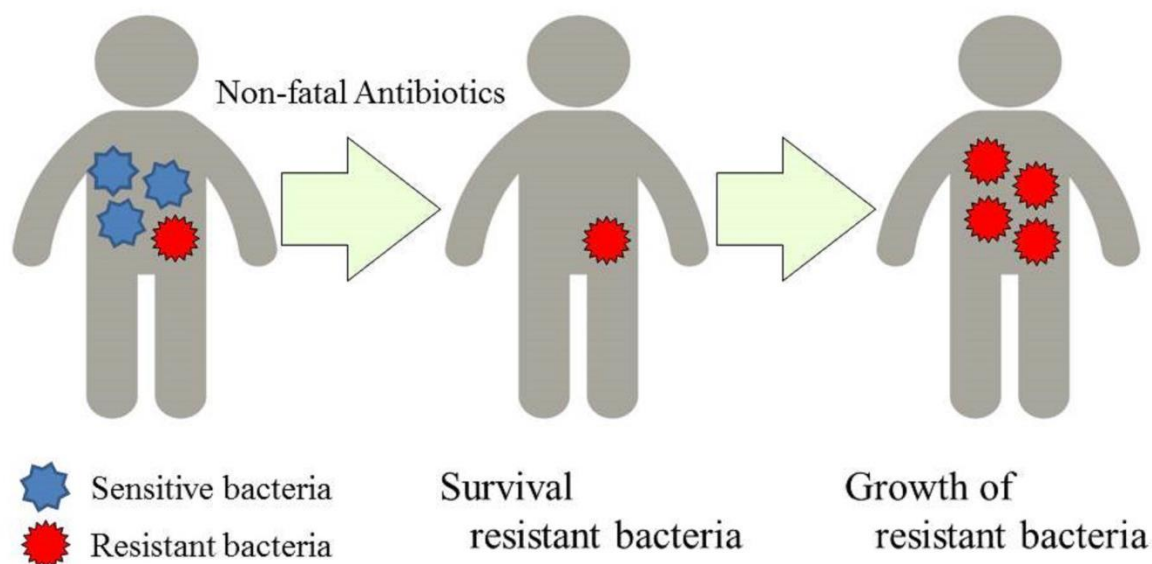


Fig. 1-3 Schematic illustration of antibiotic pressure and increase of resistant bacteria

1.3. 薬剤投与の理想と現実とフレミングの予言

Fig. 1-4A は、ドラッグリリースの分野において理想的とされる徐放曲線モデルで、0 次放出を表している。初期バーストの後に最高血中濃度に到達し、その後一定の薬剤放出が期待されるが、このとき、薬剤放出を最小有効濃度 (Minimum Effective Concentration; MEC) と最小中毒濃度 (Minimum Toxic Concentration; MTC) の間の有効域で維持することが望まれる¹³。しかしながら、Fig. 1-4B に示したように、薬剤耐性化を防ぐという観点から言えば、MEC は感受性菌の最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) に相当し、これと MTC との間に耐性菌の MIC が存在する。この感受性菌および耐性菌それぞれの MIC の間の領域は、Mutant Selection Window (MSW) と呼ばれ、耐性菌が極めて増殖しやすい薬剤濃度領域となる¹⁴。つまり、薬剤耐性化を防ぎ、同時に薬効を最大限に引き出すためには、0 次放出は、MTC と耐性菌の MIC の間で維持することが求められる。また現実世界では、0 次放出を維持することは難しい場合が多く (Fig. 1-4B-a)、血中濃度または徐放曲線は時間と共に減衰する。この場合、MSW 領域に長期間留まることは耐性菌を増殖させる危険性があるため (Fig. 1-4B-b)、追加での投与、もしくは減衰するならば、MSW 領域はむしろ迅速に通過して減衰する方が理想的であると考えられる (Fig. 1-4B-c)。

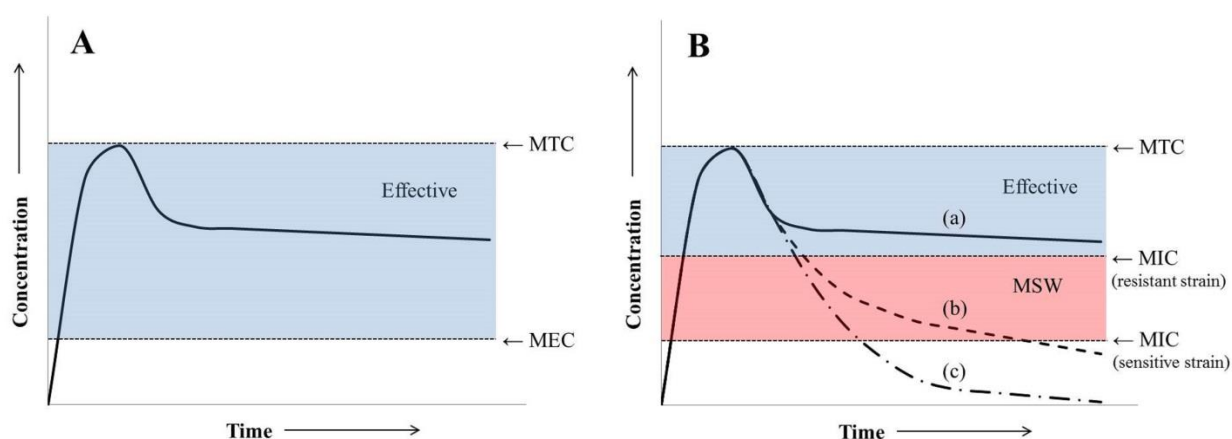


Fig. 1-4 Ideal drug release and blood level models

ペニシリンの発見者・フレミングは、1945 年ノーベル医学生理学賞の受賞講演の中で、次のように述べている¹¹。

「ペニシリンが商店で誰でも買うことができる時代が来るかもしれない。そのとき、無知な人が必要量以下の用量で内服して、体内の微生物に非致死量の薬剤を曝露させることで、薬剤耐性菌を生み出してしまう恐れがある。」

耐性菌は古来の洞窟や永久凍土からも発見されており^{15,16}、その存在自体は知られていたが、人類の脅威として考えられるようになったのはもちろんペニシリン以降の話であり、フレミングがその耐性化機構を既に把握していたかは不明だが、その予言が的中していたことは上述した通りである。

1.4. 耐性菌等難治性感染対策

1.4.1. 新薬開発

耐性菌に対して新薬で対抗するという選択肢はないのだろうか。Fig. 1-5 が示すように、日本のみならず世界的に新規抗菌薬開発は縮小傾向にある。新薬開発には莫大な時間とコストがかかる反面、すぐに耐性化してしまう危険性があり、また抗がん剤や慢性疾患と比較して投与期間が短いなどの背景から、製薬企業にとっては採算が合わず、新規抗菌薬開発から撤退するケースが多いことなどが理由として挙げられる。官民連携した新薬開発も課題のひとつではあろうが、打開策としてはやはりその適切な使い方や投与方法にあると考えられる。

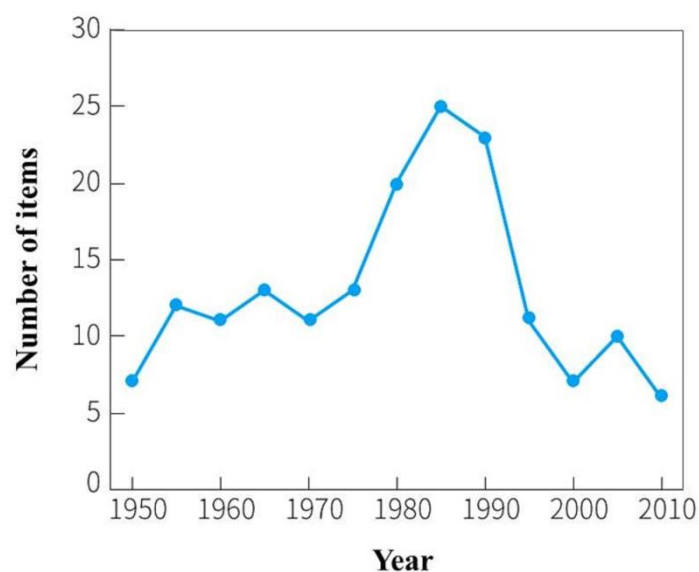
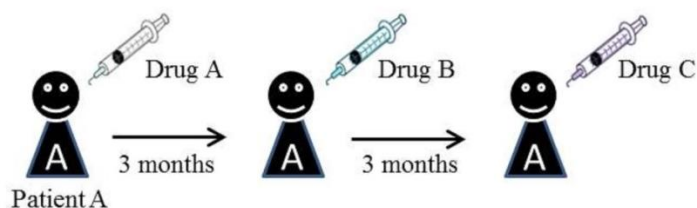


Fig. 1-5 Number of items in antibiotic development in Japan¹⁷

1.4.2. 投与方法 (抗菌薬ローテーション)

投与方法に関しては、これまでの経緯を踏まえれば、偏りのない抗菌薬使用 (antibiotic heterogeneity)、つまり、「抗菌薬ローテーション」という考え方が提唱されるのは必然といえる。抗菌薬ローテーションという名称からして、抗菌薬の耐性化防止に特化した理論である。抗菌薬に限らず抗がん剤でも何でも、薬剤は多かれ少なかれ耐性化する可能性と危険性を秘めている。しかしながら、抗菌薬に限ってこのような理論が存在するのは、耐性化した際のリスクの大きさが関係していると考えられる。例えばある抗菌薬が耐性化して効果がなくなった場合、他の患者に感染し、最悪の場合複数人が亡くなる可能性もある。また、院内感染などに拡大すれば病院の評判は急落してしまうことなどから、他の薬剤とは一線を画した特殊な対策が講じられるのではないかと考えられる。その抗菌薬ローテーションには、一定期間毎に使用する抗菌薬を変更するサイクリング療法と、患者毎に抗菌薬を変更するミキシング療法が含まれ (Fig. 1-6)、2001 年に Raymond らが報告して以来¹⁸、盛んに議論されるようになった。一定の成果が得られたとする報告も散見されるが¹⁹、抗菌薬を変更するのは逆に耐性菌を誘発するのでは、という批判的な見解もあるなど、効果の明確な結論は得られていない。

<Cycling therapy>



<Mixing therapy>

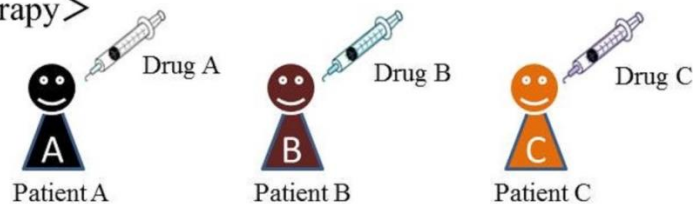


Fig. 1-6 Schematic illustration of antibiotic rotation including cycling therapy and mixing therapy

1.4.3. 多剤併用療法という試み

頼みの綱である抗菌薬は耐性化し、新薬開発も縮小傾向という時代背景からしばしば行われるのが、多剤併用療法である。多剤併用療法とは、作用機序の異なる複数の薬剤を同時もしくは時間差で作用させる治療法で、抗菌薬のみならず抗がん剤や様々な薬剤で効果があると報告されている。多剤併用療法の意義は、一般に大きく分けて2つあり、単剤では十分な薬効が得られない場合の相乗効果（シナジー）や、逆に副作用が強く出る場合などに、用量を減らして感受性を拡大させるなどの効果が期待される（Fig. 1-7）。

Synergistic effects



Complementation of sensitivity

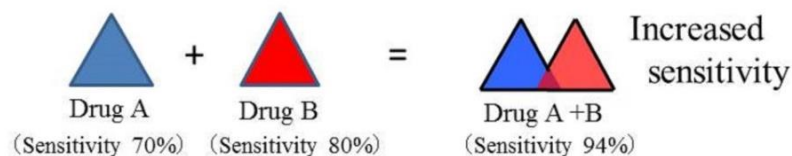


Fig. 1-7 Schematic illustration of significance of multidrug therapy

1.4.4. ドラッグデリバリーシステム (DDS)

DDS とは、薬物を必要な時に、必要な場所に、必要な量作用させることを基本コンセプトとした薬剤投与方法で、患部までの輸送および患部での徐放を制御することを目的としている。このような投与方法を用いることで、特に局所投与できる場合は、肝臓など解毒作用のある臓器を通過することなく、また副作用の原因ともなる血中への移行も抑えながら、疾患部位に薬剤を高濃度で直接作用させることができる。DDS の実現には、薬剤を担持して血中を移動することが出来る、またそれを放出することができる医療材料の設計がキーファクターとなる。これまで数多くの DDS 材料が報告されてきたが、例えばアムビゾーム（大日本住友製薬）は抗菌薬アンホテリシン B を、ドキシル（ヤンセンファーマ）は抗がん剤ドキソルビシンを、それぞれリポソームと呼ばれるリン脂質二重膜に内包したナノカプセルで (Fig. 1-8)、本邦で上市された DDS 製剤の代表選手といえる^{20,21}。しかしながら、このように一見理想的とも思える DDS 製剤であるが、諸外国と比較してその国内認可は著しく遅れを取っており、前述のアムビゾームでは 16 年、ドキシルでは 12 年を要した²⁰。その背景には、文化、環境、法律の違いにより欧米の新薬の導入が遅れるという、いわゆるドラッグ・ラグの社会問題があると指摘されている²⁰。一方で、医療材料の設計がキーファクターと述べたが、例えばその医療材料メーカーが薬剤活性を付与した製品を開発したとき、その製品の Kategorii は医薬品と見なされる場合もあり、それにより臨床治験や認可のハードルが極めて高くなるため、開発を遅らせる原因の一つになっていると考えられる。今後、DDS 製剤開発企業にとって追い風となる環境が整備されていくのか、注目されるところである。

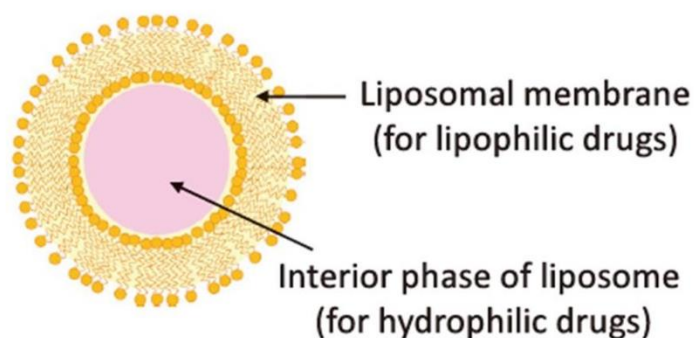


Fig. 1-8 Schematic illustration of liposome. Hydrophilic drugs and lipophilic drugs can be contained in interior phase of liposome and liposomal membrane, respectively²².

1.4.5. コンビネーションプロダクト

DDS を広義に捉えれば、コンビネーションプロダクトというカテゴリーが浮かび上がってくる。コンビネーションプロダクトとは、医薬品や医療機器および生物学的製剤等を組み合わせた、診断もしくは治療を目的とした製品である。長期的もしくは恒久的に体内に挿入して使用される医療機器は感染症の原因となり得る、という基本的背景から、医薬品との併用もしくは複合化などの形態は極めて合理的と考えられ、移植型 DDS としての趣も有する。Fig. 1-9 は、コンビネーションプロダクトの世界市場の推移である²³。2012 年から 2017 年にかけての年平均成長率は約 10%を示しており、日本の医療機器市場全体の成長率が近年 5%以下であることを加味すれば²⁴、極めてニーズの高い分野であり、今後も同様な伸びを示すと考えられている。

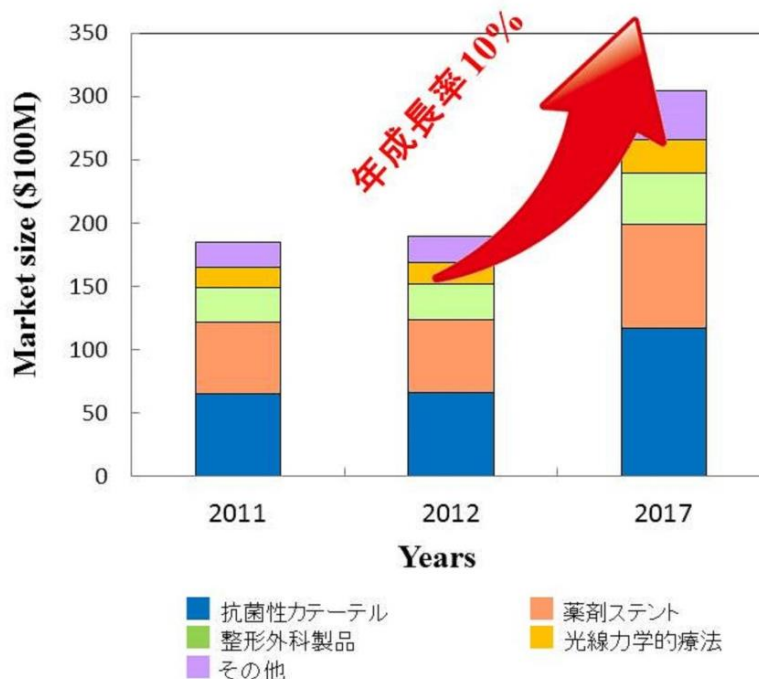


Fig. 1-9 Global markets for drug-device combinations

1.5. 本論文の主題と構成

1.5.1. 本論文の主題

超高齢化社会を前に、例えば整形外科領域におけるコンビネーションプロダクトに目を向けてみると、米国で流通している骨セメントの約 75%には抗菌薬が内包されている²³。この傾向は、今後日本をはじめとする諸外国にも波及していくと考えられるが、薬剤と医療機器が併用されることにより、それぞれ単独使用では見られなかった相互作用が発生する可能性もあり、さらに材料の複合化、多剤内包と系が複雑になればなるほど、考慮しなければならない事象は増えると考えられる。本研究では、無機、有機、無機-有機複合体のカテゴリーに分けて、それぞれの材料を用いた薬物放出や、そこに発生する相互作用を分析し、効果的な材料設計における留意点を提案することを目的とする。

1.5.2. 本論文の構成

本学位研究の背景 (本章)に続き、以降の構成を Table 1-2 に示す。第 2 章では、無機材料を用いた薬物放出として、リン酸カルシウム骨ペーストを取り上げ、抗菌薬バンコマイシン、ゲンタマイシンを内包した際の薬物放出、および相互作用を検証する。第 3 章では、有機材料を用いた薬物放出として、ポリカプロラクトン (PCL)を取り上げ、スマートフィルムを合成する。「スマート」である所以、PCL に着目した意義などを解説し、また、抗がん剤パクリタキセル (PTX)、カルボプラチン (CBDCA)を内包した際の薬物放出、および相互作用を検証する。第 4 章では、無機-有機複合体を用いた薬物放出として、磁性ナノ粒子-PCL 複合化フィルムを作製し、PTX、CBDCA を内

包した際の薬物放出、および相互作用を検証する。最後に第5章では、結言として前章までに検証した各種相互作用をまとめ、その原因と、コンビネーション化学療法を効果的に制御する方法を提言する。

Table 1-2 Guidelines for this study indicating the materials and drugs used in each chapter

	第2章	第3章	第4章
	無機材料	有機材料	無機－有機複合体
基材	リン酸カルシウム骨ペースト	ポリカプロラクトン (PCL)	磁性ナノ粒子－PCL複合体
薬剤	バンコマイシン ゲンタマイシン	パクリタキセル カルボプラチン	パクリタキセル カルボプラチン

1.6. 参考文献

- 1 北里一郎, ペニシリンの歩んできた道. 日本化学療法学会雑誌 **1997**, 45, 698-700.
- 2 アランナ・コリン, あなたの体は9割が細菌 微生物の生態系が崩れはじめた, 河出書房新社, **2016**.
- 3 真智俊彦; 宮本幸恵, β ラクタム剤の作用と耐性機序 (ESBLを含む). 恵寿総合病院医学雑誌 **2012**, 1, 4-7.
- 4 米国 CDC, *Antibiotic resistance threats in the United States* **2013**.
- 5 花木秀明; 久保亮一, 検査や化学療法を混乱させる薬剤耐性菌の狡猾な耐性誘導機構ーグラム陰性菌の耐性誘導を中心としてー. *The Chemical Times* **2008**, 1, 11-16.
- 6 Jacobs, C.; Frere, J. M.; Normark, S., Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible β -lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell* **1997**, 88, 823-832.
- 7 Satake, S.; Yoshihara, E.; Nakae, T., Diffusion of beta-lactam antibiotics through liposome membranes reconstituted from purified porins of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **1990**, 34, 685-690.
- 8 Dall, L.; Barnes, W. G.; Lane, J. W.; Mills, J., Enzymatic modification of glycocalyx in the

- treatment of experimental endocarditis due to viridans streptococci. *Journal of Infection Disease* **1987**, *156*, 736-740.
- 9 Hartman, B. J.; Tomasz, A., Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **1984**, *158*, 513-516.
- 10 小澤真名緒, 一動物用抗菌性物質を取り巻く現状 (IV)ー 薬剤耐性機構. *日本獣医師会雑誌* **2016**, *69*, 713-717.
- 11 厚生労働省, 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020.
- 12 上島悦子, 抗菌薬使用の適正化. *ICT Monthly* **2006**, *123*.
- 13 妹尾学; 黒柳能光, 医薬徐放システムにおける膜の利用. *油化学* **1985**, *34*, 806-813.
- 14 橋本一; 村山琮明, 病原菌の薬剤耐性化と生命の進化. *日本臨床微生物学雑誌* **2013**, *23*, 1-11.
- 15 Bhullar, K.; Waglehner, N.; Pawlowski, A.; Koteva, K.; Banks, E. D.; Johnston, M. D.; Barton, H. A.; Wright, G. D., Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One* **2012**, *7*, e34953.
- 16 Nesme, J.; Cecillon, S.; Delmont, T. O.; Monier, J. M.; Vogel, T. M.; Simonet, P., Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Current Biology* **2014**, *24*, 1096-1100.
- 17 舘田一博, 抗菌薬開発停滞の打破へ向けて. *日本内科学会雑誌* **2013**, *102*, 2908-2914.
- 18 Raymond, D. P.; Pelletier, S. J.; Crabtree, T. D.; Gleason, T. G.; Hamm, L. L.; Preutt, T. L.; Sawyer, R. G., Impact of a rotating empiric antibiotic schedule on infectious mortality in an intensive care unit. *Critical Care Medicine* **2001**, *29*, 1101-1108.
- 19 草地信也; 炭山嘉伸, 一般外科病棟における抗菌薬サイクリング. *Progress in Medicine* **2005**, *25*, 2343-2346.
- 20 菊池寛; 石原比呂之; 鈴木卓也, 医薬品のライフサイクルマネジメントと DDS 開発. *Drug Delivery System* **2011**, *26*, 99-105.
- 21 Barenholz, Y., Doxil[®] –the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of Control Release* **2012**, *160*, 117-134.
- 22 田上辰秋; 尾関哲也, ナノ・マイクロ粒子の DDS 技術と臨床応用. *Organ Biology* **2017**, *24*, 54-60.

- 23 BCC Research, Global markets for drug-device combinations. **2010**.
- 24 厚生労働省, 薬事工業生産動態統計(年報) **2016**.

第 2 章

無機材料を用いた薬物放出

2.1. 諸言

本章では、無機材料を用いた薬物放出としてリン酸カルシウム骨ペーストを取り上げ、その薬物放出や相互作用を検証する。

2.1.1. リン酸カルシウム骨ペースト (CPC)

CPC とは、 α 型リン酸三カルシウム (α -TCP)を主成分とする粉剤と、水系の専用液剤を練和してペースト状にすることで、複雑な骨欠損部にも隙間なく補填出来ることを特徴とするペースト状人工骨である (Fig. 2-1)¹。補填後はハイドロキシアパタイトに転化しながら硬化し、24 時間で 80 MPa 以上の強度を発現する。また反応による発熱がほとんど認められず、優れた骨伝導性と生体適合性を示すため、整形外科のみならず、脳神経外科や形成外科など幅広い分野における固定補助や間隙の充填などの目的で使用されている。



Fig. 2-1 (A) Powder and dedicated solvent constituting CPC, (B) CPC paste before implantation, and (C) X-ray image of the knee joint after implantation²

2.1.2. 抗菌薬との併用

整形外科領域の術後感染は、入院期間の延長、四肢の切断、高齢者では死亡率が上昇するなど深刻化する場合が多く、その発生率は部位により異なるが、整形外科手術では 0.5-3.0%³⁻⁵、脳神経外科手術では 11-34%にも昇ると言われている^{6,7}。術後感染治療は従来、広範囲デブリドメント、抗菌薬の全身投与、ポリメチルメタクリレート (PMMA)セメントを用いた抗菌薬の局所投与が行われてきた。しかしながら近年、CPC が PMMA セメントと比較して、抗菌薬の放出を高濃度かつ長期間維持することができると報告された^{8,9}。さらに生体適合性や、反応熱の影響が極めて小さいことから、PMMA セメントよりも併用できる抗菌薬の制限が少なく、今現在でも標準治療としては採用されてはいないものの、医師の裁量による良好な臨床成績が数多く報告されている^{10,11}。

2.1.3. 多剤内包 CPC

Table 2-1 は、2017 年における整形外科手術手技別の術後感染症の発生件数、同じく Fig. 2-2 は、それらの原因となった主要 3 菌種の件数を示している¹²。整形外科領域における術後感染の原因菌としては黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) がもっとも多いが、その内ほぼ半数の赤色で示したのが、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) と呼ばれる耐性菌で、難治性の感染症や院内感染を引き起こす場合もある。MRSA 骨髄炎の治療における抗菌薬投与は、そのバイオフィルムを破壊するための高濃度初期バーストと、一般的な骨髄炎よりも長期 (6 週以上) に渡る持続作用、複数の抗菌薬の併用などが必要とされている^{13,14}。そのため、CPC に多剤内包させて相乗効果を図ることは有効な手段の一つと考えられるが、これまでに、2 種類以上の抗菌薬を内包した CPC からの放出挙動は検証されたことがなかった。そこで、CPC に抗菌薬バンコマイシン (VCM)、及びゲンタマイシン (GM) を内包させ、それぞれの放出挙動を *in vitro* で評価することを試みた。

Table 2-1 Number and incidence of surgical site infections (SSI) in 2017

Surgical technique	Number of surgery	Number of SSI	Incidence of SSI (%)
AMP	436	37	8.5
FUSN	9,186	172	1.9
FX	19,726	146	0.7
HPRO	12,732	84	0.7
KPRO	10,125	71	0.7
LAM	7,804	107	1.4
RFUSN	157	1	0.6

AMP: 四肢切断術

FUSN: 脊椎固定術

FX: 骨折の観血的整復術

HPRO: 人工股関節

KPRO: 人工膝関節

LAM: 椎弓切除術

RFUSN: 脊椎再固定術

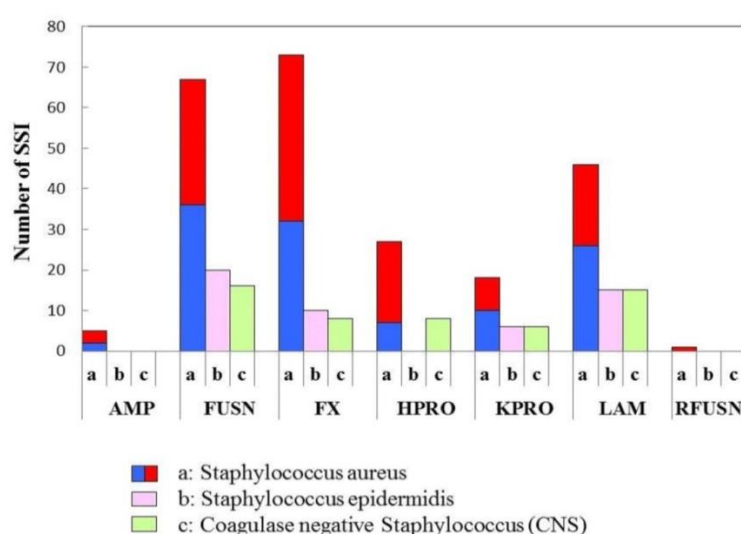


Fig. 2-2 Number of bacteria which caused SSI in 2017. The red area of the *Staphylococcus aureus* group shows MRSA.

2.2. 実験¹⁵

2.2.1. 試薬

本章で使用した試薬および装置のリストを下記に示す。

Table 2-2 Reagent list used in this section

Reagent	Abbreviation	Company	Location
BIOPEX [®] -R Advance	CPC	HOYA Technosurgical Corporation	Tokyo, Japan
Surgical Simplex [®] P bone cement	PMMA cement	Stryker Japan K.K.	Tokyo, Japan
Ceramic hydroxyapatite, Type II, 40 μ m	CHT	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, CA, USA
Vancomycin hydrochloride	VCM	Shionogi & Co., Ltd.	Osaka, Japan
Gentamicin sulfate	GM	Nichi-Iko Pharmaceutical Co., Ltd.	Toyama, Japan
Sodium chloride	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Potassium chloride	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Disodium hydrogenphosphate 12-water	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Sodium dihydrogenphosphate 2-water	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Potassium dihydrogen phosphate	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Lysozyme, from chicken egg white	—	Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
Triethylamine	TEA	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid	TNBS	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Sodium hydrogen carbonate	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Phosphoric acid	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Acetonitrile for HPLC	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Tetrahydrofuran	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Sodium sulfate	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan

Sodium 1-pentanesulfonate	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Acetic acid	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Methanol	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
o-Phthalaldehyde	OPA	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
2-Mercaptoethanol	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Boric acid	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Potassium hydroxide	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Cefazolin sodium	CEZ	Nichi-Iko Pharmaceutical Co., Ltd.	Toyama, Japan
Teicoplanin	TEIC	Fuji Pharma Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Zyvox [®]	LZD	Pfizer Japan Inc.	Tokyo, Japan

Table 2-3 Experimental device list used in this section

Device	Model	Company	Location
High-performance liquid chromatography (HPLC) column	CAPCELL PAK C18 UG120	Osaka Soda Co., Ltd.	Osaka, Japan
HPLC device	Elite LaChrom	Hitachi High-Technologies Corporation	Tokyo, Japan
Spectrophotometer	UV-1800	Shimadzu Corporation	Kyoto, Japan
Mercury porosimeter	AutoPore IV9520	Micromeritics Instrument Corporation	Norcross, GA, USA
X-ray diffractometer (XRD)	RINT-Ultima III	Rigaku Corporation	Tokyo, Japan
Scanning electron microscope (SEM)	S-4300	Hitachi High-Technologies Corporation	Tokyo, Japan

2.2.2. 試験方法

CPC の粉剤 (Powder)、専用液剤 (Solvent)、および VCM、GM を Table 2-4 の割合で練和し、円錐台形のモールドに充填して 37°C、3 hr 硬化した。このとき、液体抗菌薬である GM を添加する際に、当量の専用液剤量を減じる必要がある。この操作をしなければ液体成分過多となり、ペーストが硬化しなくなる可能性がある。逆に練和性など、専用液剤中の成分が減じられることによるデメリッ

トも考えられるが、硬化する条件の方が優先される。硬化後の試料を 20 mL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に浸漬し、毎日全量を回収して新しい PBS と交換した。回収液中の薬剤濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法で測定した。PBS の調製方法は、セクション 2.2.3. で説明する。

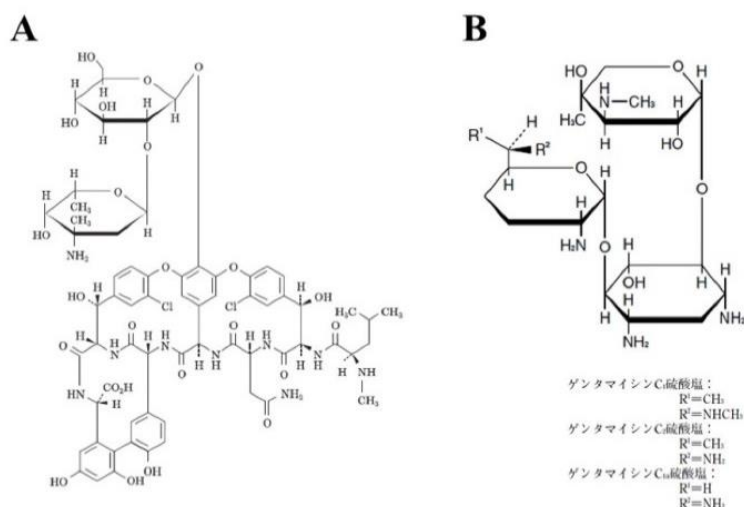


Fig. 2-3 Molecular structure of (A) VCM¹⁶ and (B) GM¹⁷

Table 2-4 Composition for test sample preparation

Test sample	Powder (g)	Solvent (mL)	VCM (g)	GM (mL)
Original	12	2.6	—	—
VCM only	12	2.8	0.30	—
GM only	12	0.80	—	2.0
VCM + GM	12	0.80	0.30	2.0

2.2.3. PBS 調製方法

本研究で使用した PBS はすべて、下記 Table 2-5 に記載の組成により事前に調製した¹⁸。この組成における最終的な pH は 7.40 を示した。一般的に、PBS の組成は様々なものがあり¹⁹、調製済みの市販品であってもロット差が懸念されることから、各研究室において自作 (Laboratory-made) の PBS を調製し、一貫して使用するのが望ましい。通常は 10 倍濃度のストック溶液を調製しておき、適宜ミリ Q 水で希釈して用いられる。

Table 2-5 Composition for PBS preparation

Reagent	Composition	Concentration
Sodium chloride	8.00 g	137 mM
Potassium chloride	0.200 g	2.70 mM
Disodium hydrogenphosphate 12-water	2.90 g	8.10 mM
Potassium dihydrogen phosphate	0.200 g	1.50 mM
Ultra pure water	up to 1,000 mL	—

2.2.4. VCM の分析方法²⁰

2.2.4.1. 移動相の調製

水 2,000 mL に triethylamine (TEA) 4 mL を加え、phosphoric acid を滴下し、pH3.2 に調整した。これを TEA 緩衝液としたとき、以下の割合で調製したものを、VCM の HPLC 分析用移動相とした。

TEA 緩衝液 : acetonitrile : tetrahydrofuran = 92 : 7 : 1

2.2.4.2. HPLC 条件

逆相カラム CAPCELL-PAK C18 UG120 (5 μ m, ϕ 4.6 mm \times 250 mm)を、HPLC 装置 Elite LaChrom に装着して用い、分析条件は、上述した移動相のイソクラティック溶離 (20 min)とした。測定試料 20 μ L を、流速 1.0 mL/min、吸光度 280 nm で測定した。あらかじめ調製した VCM 標準液 (5, 50, 500 μ g/mL)のクロマトグラムにおいて、得られたピーク面積とその濃度から検量線を作成した。次いで、測定試料のクロマトグラムにおいて、得られたピーク面積と先の検量線から、測定試料中の VCM 濃度を算出した。

2.2.5. GM の分析方法

2.2.5.1. ストラテジー

Fig. 2-3B からわかるように、GM は特異的な紫外-可視吸収スペクトルを示す官能基をもっており、通常 GM の定量分析は、Enzyme-Linked Immuno Solvent Assay (ELISA)法や、蛍光偏向免疫測定法 (FPIA)などが用いられる。しかしながら、それらに用いられる試薬は一般的に高価であり、特別な技術も求められるため、本研究では、Anhalt によるポストカラムラベル法に従って行った²¹。つまり、Fig. 2-4 に示したように、通常の HPLC のラインに三方活栓で蛍光試薬 o-phthalaldehyde (OPA)を注入することで、GM の 1 級アミノ基をインラインで蛍光ラベル化するという手法である (Fig. 2-5)。蛍光試薬の中でも OPA が選ばれる理由としては、その反応の速さにあり、GM がカラムの出口から蛍光検出器に到達するまでの間 (Fig. 2-4 中の緑ライン)にラベリングする必要があるが、pH (10 <)、触媒 (2-mercaptoethanol)、温度 (60°C)の条件が揃えば、OPA のラベリングは数秒で完結する。

2.2.5.2. 移動相の調製

Sodium sulfate 56.816 g、sodium 1-pentanesulfonate 6.968 g、acetic acid 2 mL を水で 2,000 mL にメスアップし、この 1,940 mL と methanol 60 mL を混合したものを、GM の HPLC 用移動相とした。

2.2.5.3. OPA 溶液の調製

Boric acid 24.7 g を水 900 mL に溶解させ、約 10 M の potassium hydroxide を滴下して pH10.4 に調整した。これを水で 1,000 mL にメスアップしたものを、K-B 緩衝液とした。次に、OPA 60 mg に methanol 1 mL を加え溶解し、2-mercaptoethanol 0.2 mL を加え軽く振り混ぜた。これを K-B 緩衝液 100 mL に添加して、OPA 溶液とした。

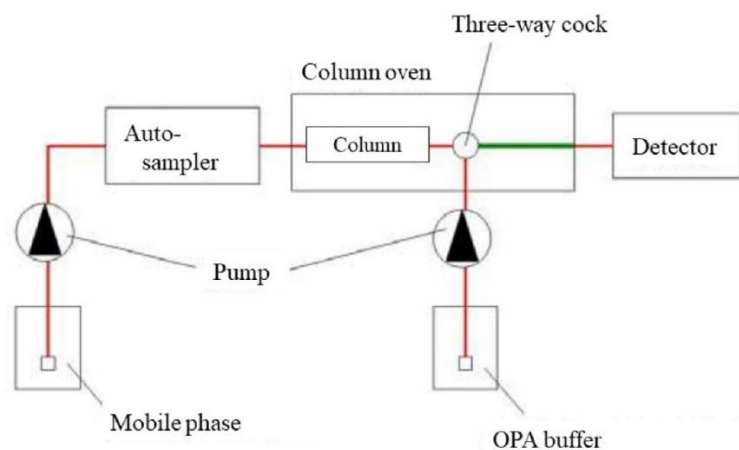


Fig. 2-4 Schematic illustration of post-column labelling method

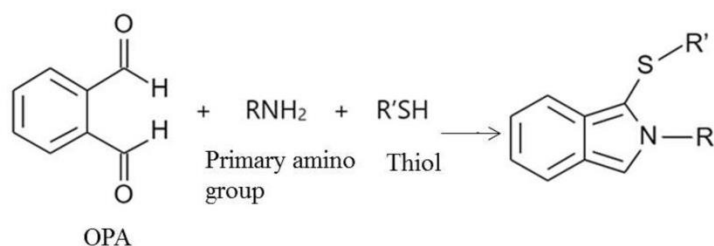


Fig. 2-5 Schematic illustration of fluorescent labeling with OPA

2.2.5.4. HPLC 条件

逆相カラム CAPCELL-PAK C18 UG120 (5 μm , $\phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$)を、HPLC 装置 Elite LaChrom に装着して用い、分析条件は、上述した移動相のイソクラティック溶離 (10 min)とした。カラムオーブンは 60°C とした。測定試料 20 μL を、移動相の流速 1.5 mL/min、OPA 溶液の流速 0.5 mL/min、励起波長 340 nm、蛍光波長 440 nm で測定した。あらかじめ調製した GM 標準液 (0.5, 1.0, 2.5 $\mu\text{g/mL}$) のクロマトグラムにおいて、得られたピーク面積とその濃度から検量線を作成した (Fig. 2-6)。次いで、測定試料のクロマトグラムにおいて、得られたピーク面積と先の検量線から、測定試料中の GM 濃度を算出した。

2.3. 結果

Fig. 2-7A に VCM の累積の放出曲線を示した。VCM 単剤内包の CPC と比較して、2 剤内包 CPC からの VCM の放出は抑制された。特に初期バーストが抑えられており、耐性菌を生き残らせてしまう可能性も危惧された。一方で、Fig. 2-7B は GM の放出曲線であるが、2 剤内包 CPC と GM 単剤内包 CPC では、ほぼ同等の放出挙動を示した。

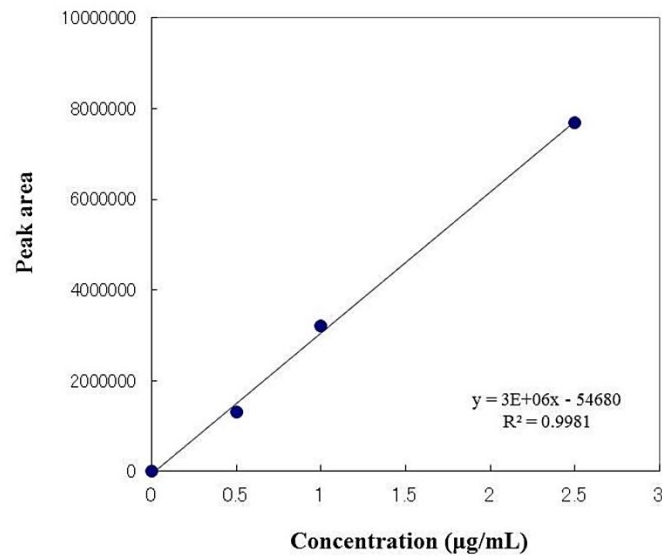


Fig. 2-6 Calibration curve of GM using OPA labeling method showing good linearity

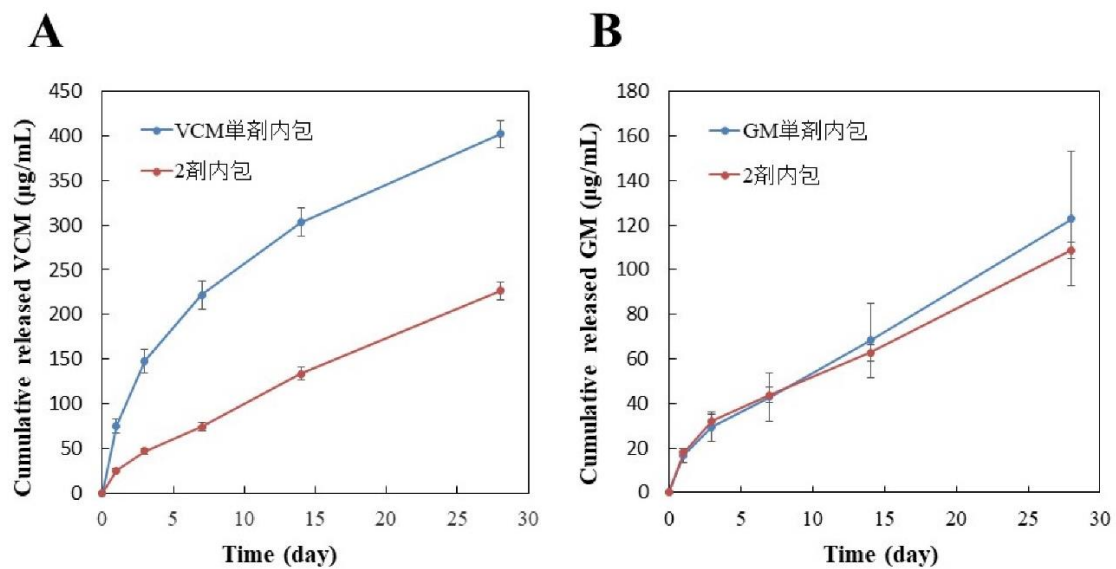


Fig. 2-7 (A) Cumulative release of VCM from “VCM-” and “VCM and GM-” impregnated CPC and (B) cumulative release of GM from “GM-” and “VCM and GM-” impregnated CPC

2.4. 検証と考察

2.4.1. 薬剤－薬剤間相互作用

2 剤内包試料から VCM の溶出が抑制される事象に関して、その原因の検証を行った。まず薬剤－薬剤間相互作用の調査を行った。想定していたシナジー効果が得られなかったわけであるが、2 剤併用する上でもっとも大前提となるのが、薬剤－薬剤間相互作用がない、もしくは無視できるこ

とであると考えられる。一般的に、ある薬剤と他の薬剤が混合されたとき、外観や色合い、活性に至るまで、その配合変化に関しては、その薬剤の製造業者がよく調査している。今回、VCM 製造元である塩野義製薬の配合変化表を調査したところ、GM との混合後 24 hr の観察で、外観、pH、残存力価に変化はなかった (Fig. 2-8)。したがって、VCM と GM における薬剤－薬剤間相互作用はない、もしくは無視できるレベルであると考ええる。

分類	配合剤			外 観				pH				残存力価 (%)				備考
	販売名 (会社名)	配合法	配合量	直後	3時間後	6時間後	24時間後	直後	3時間後	6時間後	24時間後	直後	3時間後	6時間後	24時間後	
組織細胞株	注射用フィルデシン1mg (塩野義)	III	1 mg	無色澄明	無色澄明	無色澄明	無色澄明	3.95	3.93	3.94	3.95	100	99.5	99.6	99.7	
	エクザール注射用10mg	III	1 g	無色澄明	無色澄明	無色澄明	無色澄明	3.95	3.93	3.94	3.95	100	99.5	99.6	99.7	
組織細胞株	(塩野義)	III	1 g	澄明	澄明	澄明	澄明	4.40	NT	4.82	NT	100	99.9	99.9	99.9	
	シオマリン静注用1g (塩野義)	III	1 g	極微黄色 澄明	極微黄色 澄明	極微黄色 澄明	微黄色澄明	5.22	NT	5.00	NT	100	99.6	98.9	94.7	
	ゲンタシン注60* (シェリング・プラウ)	III	60 mg/ 1.5 mL	無色澄明	無色澄明	無色澄明	無色澄明	3.89	NT	3.90	NT	100	99.9	100.6	100.0	

Fig. 2-8 Combination change of VCM tested by Shionogi

2.4.2. 薬剤－材料間相互作用

次に薬剤－材料間相互作用、とりわけ薬剤と CPC の吸着反応を検証した。前述の通り、CPC はリン酸カルシウム的一种であり、ハイドロキシアパタイトに転化しながら硬化する。ハイドロキシアパタイトは、カルシウムイオンとリン酸基を有することから、両性イオン交換体のようなタンパク質吸着挙動を示すことが知られている^{22,23}。そのため、CPC と薬剤の吸着相互作用の影響を検証した。

検証用資材として、タンパク質精製用ハイドロキシアパタイト球状粒子 (CHT, Type II, 40 μm) を用い、試験溶液は 1 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) を用いた。本試験溶液は、1 mM sodium dihydrogenphosphate 2-water、および 1 mM disodium hydrogenphosphate 12-water を混合して調製した。上記緩衝液を用いて、0.5 mg/mL の VCM 溶液、および GM 溶液を調製し、それぞれ 1 mL を 10 mg の CHT に添加した。良好な吸着を示すリファレンスとして、lysozyme も同様に調製した。室温で 30 min 回転攪拌した後 (30 rpm)、遠心分離 (8,000 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min) により上清を回収した。吸着反応前後の溶液中の薬剤濃度を、分光光度計で測定した。VCM および lysozyme の測定波長は 280 nm、GM は特異的な吸収波長帯を持たないため、2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) を用いたアミノ基の分析手法に従い²⁴、吸光度 345 nm で測定した。Fig. 2-9 に、各薬剤の CHT 1 g 当たりに対する吸着量を示した。その結果、リファレンスの lysozyme と比較して、VCM および GM は、ハイドロキシアパタイトとほとんど吸着相互作用を示さないことが示唆された。ちなみに GM の吸着は確認されなかったが、GM の TNBS 法における検出限界以下と記述した。一般的に、これら分子量 1,000 前後の薬剤は、電気的吸着に寄与できる官能基がタンパク質などと比較すると極めて少なく、ハイドロキシアパタイト上で反対電荷の反発の影響を受けることとなり、結果として吸着しにくくなる。したがって、本研究における VCM および GM と CPC の相互作用は起こらない、もしくは無視できるレベルであると考ええる。

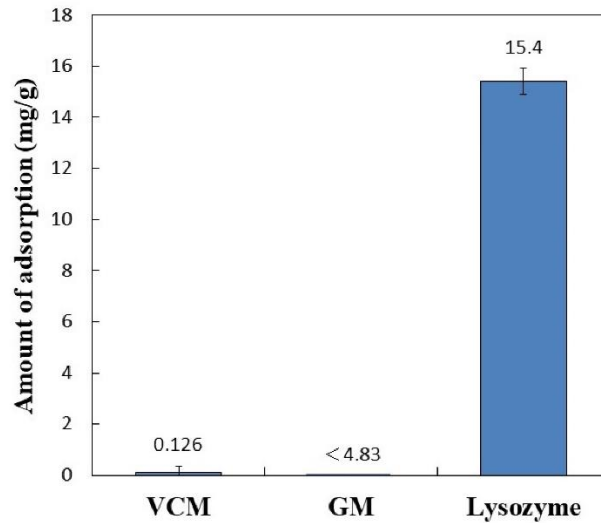


Fig. 2-9 Evaluation of adsorption interaction between each drug and hydroxyapatite

2.4.3. X 線回折分析 (XRD)

Fig. 2-10 は、各試料の硬化後 24 hr における XRD の結果であるが、VCM は元々非晶質の状態が存在し (GM は液体抗菌薬のため単独では測定せず)、CPC の硬化反応やアパタイト結晶への転移反応などは、抗菌薬の添加に関わらずほとんど変化がなかった。したがって、薬剤の内包は CPC の硬化反応、アパタイトへの転移反応には影響ないと考えられた。

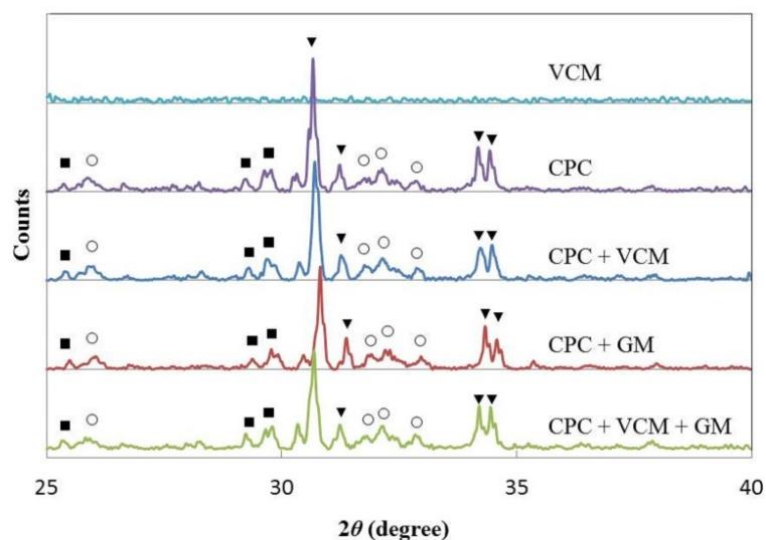


Fig. 2-10 X-ray diffraction analysis of each test sample after 24 hr setting

○ハイドロキシアパタイト
▼ α -TCP
■リン酸四カルシウム

2.4.4. 気孔径の変化

Fig. 2-11 および Fig. 2-12 は、それぞれ硬化後 24 hr の試料における、電子顕微鏡 (SEM)を用いた表面観察、および水銀圧入法を用いた細孔径分布の結果である。これらの結果は、添加する抗菌薬の種類や数によって気孔構造が変化していることを示している。特に Fig. 2-12 より、2 剤内包 CPC は、VCM 単剤内包 CPC よりも気孔径が小さくなっており、気孔は抗菌薬溶出の通り道であることから²⁵、VCM の放出は抑制されたと考えられた。一方で、2 剤内包 CPC は、GM 単剤内包 CPC よりも気孔が大きくなっており、前述の解釈によれば GM の放出は加速されると考えられる。しかしながら Fig. 2-7B より、GM の放出は 2 剤内包してもほとんど変化なかった。ここで効いてくるのが、分子の大きさと考えられる。単純に分子量を比較すれば VCM の方が約 3 倍大きく、Fig. 2-9 の結果から、薬剤とマトリックスの間に薬物放出のブレーキとなるような相互作用はないため、本薬物放出の結果は、薬剤分子の大きさと通り道の大きさ (気孔径)の関係性にほぼ帰属されるといえる。したがって、分子の大きな VCM の方が、よりセンシティブに気孔径の変化に影響を受けたと考えられる²⁶。

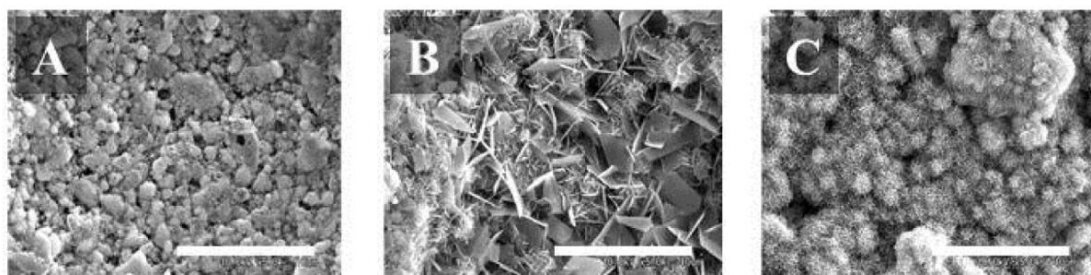


Fig. 2-11 SEM images of each test sample after 24 h setting. (Bar: 10 µm)
(A) VCM only, (B) GM only, and (C) VCM + GM

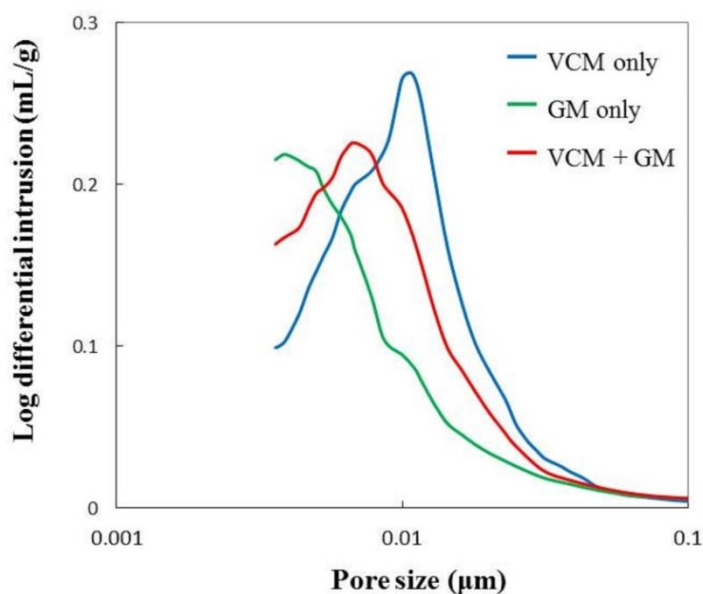


Fig. 2-12 Mercury porosimetry analysis of each test sample after 24 hr setting

2.4.5. 薬剤による傾向検証

前セクション 2.4.4.では、添加する抗菌薬の種類や数によって CPC の気孔構造が変化することが示されたが、Fig. 2-12 の結果から、2 剤内包する以前に、そもそも単剤内包の時点で気孔径が変化することが示唆された。そこで、他の薬剤でも検証することで、薬剤の種類と気孔構造の変化に傾向や相関性があるか検証した。使用した薬剤は、VCM、GM の他には、セファゾリン (CEZ)、テイコプラニン (TEIC)、ザイボックス (LZD)を用い、調製方法は、粉末抗菌薬 CEZ、TEIC に関しては Table 2-4 の“VCM only”の条件、また液体抗菌薬 LZD に関しては、Table 2-4 の“GM only”の条件と同様に行った。そして硬化後 24 hr の試料に関して、セクション 2.4.4.と同様に細孔径分布を測定した。Fig. 2-13 は、その細孔径分布の結果であるが、横軸にモード径、縦軸に気孔容積を示した。横軸をモード径とする意義は、薬物放出を司るのは細孔径分布のうち、最大頻度 (モード値)を与える気孔径と考えられるためである。薬剤を添加していない CPC (Original)群と比較して、VCM、CEZ、TEIC の粉末抗菌薬を添加した CPC の気孔は増大する傾向があり、GM や LZD の液体抗菌薬を添加した CPC の気孔は Original 群と大差なく、ほとんど変化しないという傾向が示唆された。

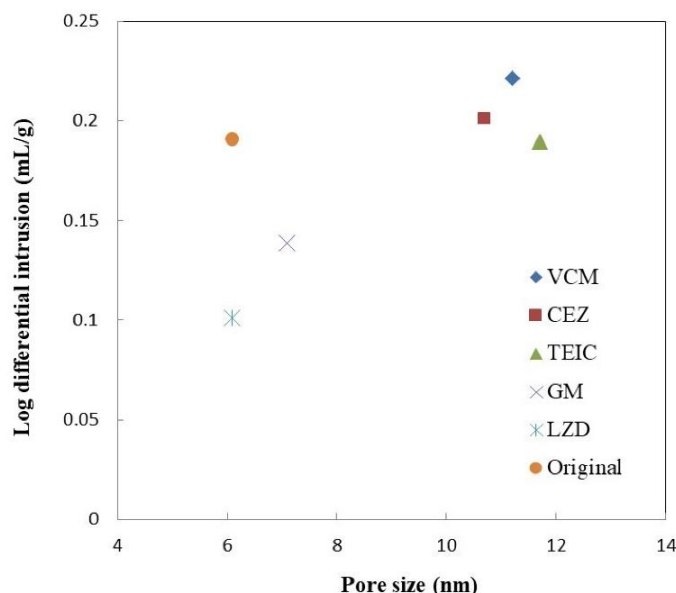


Fig. 2-13 Pore structure analysis of each test sample impregnated with various antibiotics

2.4.6. 気孔構造と薬物放出の相関

これまでの検証により、添加する薬剤の種類や数によって CPC の気孔構造が変化することが示されたが、実際に気孔径の変化と薬物放出の相関に関して体系的な考察を加えるため、さらなる検証を試みた。マトリックス型材料からの薬物放出挙動は、Higuchi の式 (Eq. 2-1)にフィッティングすることが知られている²⁷。

$$M = \{D(2C_a - C_s)C_s t\}^{1/2} \quad (\text{Eq. 2-1})$$

このとき、 M は表面積あたりの薬物放出量、 D は拡散係数、 C_a は薬剤添加量、 C_s は薬剤の溶解度、 t は時間を示す。Higuchi の式は、マトリックス内に分散した薬剤が拡散する徐放化メカニズムを示したものであるが、特に薬剤が多孔質材料の空孔を通して材料外部に放出される場合、Higuchi の式は以下の Eq. 2-2 のように改変される²⁸。

$$M = \{(D\varepsilon/\tau)(2C_a - \varepsilon C_s)C_s t\}^{1/2} \quad (\text{Eq. 2-2})$$

このとき、 ε は気孔率、 τ は曲路率を示す。曲路率とは、2 点間の直線距離 (L_0) と実際の経路長 (L) の比を意味しており、 L/L_0 で計算される。曲路率の値が大きいほど、気孔はねじ曲がるなど複雑な形状を有していることを意味しており、薬物放出の減速をもたらすことが Eq. 2-2 から確認できる。さらに、多孔質材料の気孔構造をキャピラリーモデルの集合と見なした場合、Petrasch、Vallabh らにより気孔率は ($\varepsilon = dS/4$) と表され、Eq. 2-2 は以下の Eq. 2-3 のように書き換えることができる^{29,30}。

$$M = \{(DdS/4\tau)(2C_a - dSC_s/4)C_s t\}^{1/2} \quad (\text{Eq. 2-3})$$

このとき、 d は気孔径、 S は比表面積を示す。Eq. 2-3 によると、気孔径と薬物放出に正の相関があることが理論上においても示された。

CPC に話を戻せば、気孔とはいわば、原料粉体が形成する粒子間隙と見なすことができるため、主成分である α -TCP など、CPC の原料粉体の粒径を変えることで、硬化後の CPC の気孔径を制御できると考えられる³¹。そこで、原料粉体の粒径を 2-10 μm ($2\ \mu\text{m} < C < B < A < 10\ \mu\text{m}$) の間で変化させて作製した 3 種類の CPC の粉剤に、VCM を 2.5wt% 添加して、Table 2-4 における“VCM only”の条件と同様にして試料を作製した。原料粉体 A, B, C それぞれに対応する硬化体を CPC-A, CPC-B, CPC-C とした。リファレンスとして、市販の PMMA セメントを用い、粉末ポリマー 40 g、液体モノマー 20 mL に VCM を 2.5 wt% 添加して試料を作製した。セクション 2.2.2. と同様にして薬物放出試験を行い (Fig. 2-14)、また硬化後 3 hr における SEM 観察 (Fig. 2-15) と細孔径分布 (Fig. 2-16) をセクション 2.4.4. と同様に測定した。Fig. 2-14 の VCM 放出曲線は、横軸に時間の平方根、縦軸には VCM 添加量を 100% とした際の累積の放出率をプロットして作成した。その結果、既存の PMMA セメントと比較して、CPC は VCM を高濃度かつ長期間放出を持続することができるポテンシャルを有していた。また、薬物放出率が時間の平方根に比例しており、Eq. 2-3 で示した多孔質マトリックス分散型の薬物放出関係式にフィッティングすることが示された。このことは、CPC からの薬物放出は Higuchi の式における下記の定義を満たしており、例えば、VCM と CPC との薬剤-材料間相互作用などの直線性を乱すような反応は、ほとんど起こっていないことを意味している。

Higuchi の式を満たす定義³²

1. t 時間後、マトリックス内には薬物が溶解した領域および薬物が固体として残存している領域の二つが存在する。
2. 時間の経過に伴い二つの領域の境界面が内部に進行し、薬物粒子を含む領域の厚さが減少する。
3. 薬物が溶解した領域の濃度分布は直線である。
4. 初期薬物濃度 C_a はマトリックス中での薬物の溶解度 C_s に比べて大きい。

また、Fig. 2-14 の各プロットの傾きは、Eq. 2-3 における係数に相当するため、気孔径を反映したものであると考えられる。そこで、Fig. 2-16 の細孔径分布の結果から各試料のモード径、および対応する 24 h での薬物放出量を Fig. 2-14 からそれぞれピックアップし、その関係性を Fig. 2-17 にま

とめた。ここで、Fig. 2-16 の細孔径分布の結果を見ると、ピークが分岐しているケースが見られた。これらのうち、10 nm 前後の小さい気孔群は、CPC の硬化反応の進行に伴い形成される微細構造であり、強度の発現とも深く関与している。また、それらよりも大きな気孔群は、結晶成長途上の部分、さらにはそれらがチャネリングして連通した部分と考えられ、薬剤を内包した際の、特に初期バースト効果を極めて増大させる³³。したがって、薬物放出のキーフアクターとして気孔径を議論する場合は、細孔径分布のピークが分岐していない場合は、そのピークのモード値を与える気孔径を、ピークが分岐している場合はその大きい方を、それぞれピックアップして解析するべきであろう。その結果、Fig. 2-17 より、CPC の原料粉体の粒径が大きいほど大きな気孔構造が形成され、それに伴い薬物放出を加速することが示唆された。これにより、原料粉体の粒径を制御することで、気孔径、ひいては薬物放出挙動をコントロールすることができると考えられた。

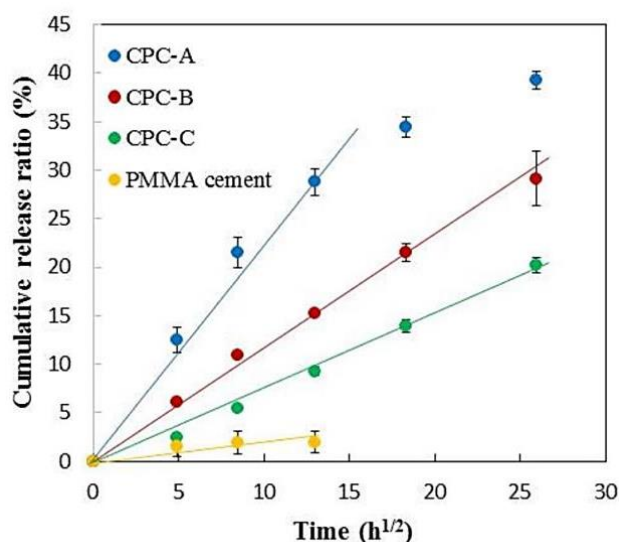


Fig. 2-14 VCM release profile using each test sample

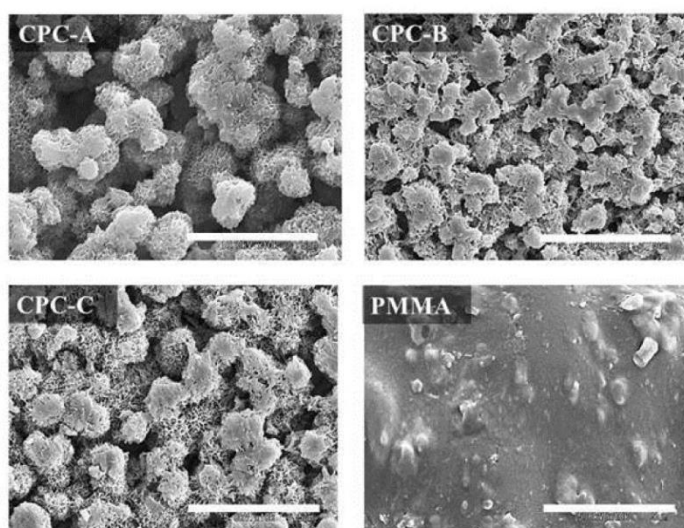


Fig. 2-15 SEM images of each test sample after 3 h setting. (Bar: 5 μ m)

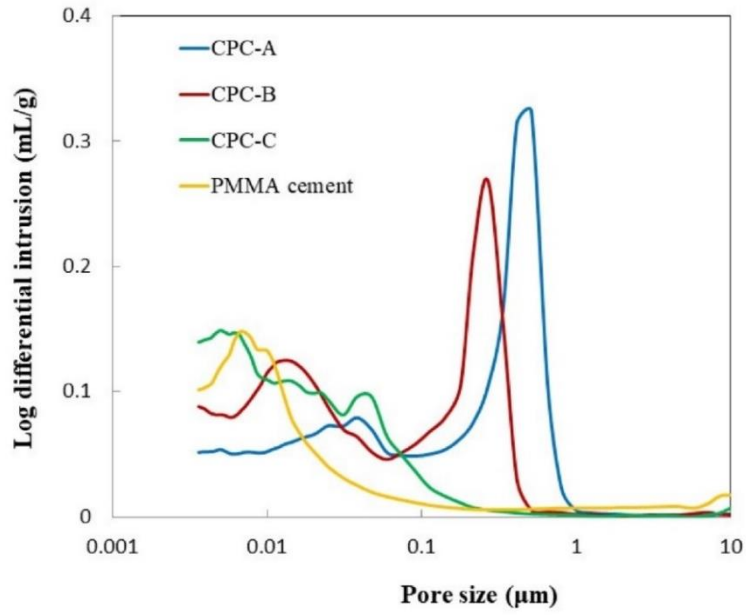


Fig. 2-16 Mercury porosimetry analysis of each test sample after 3 hr setting

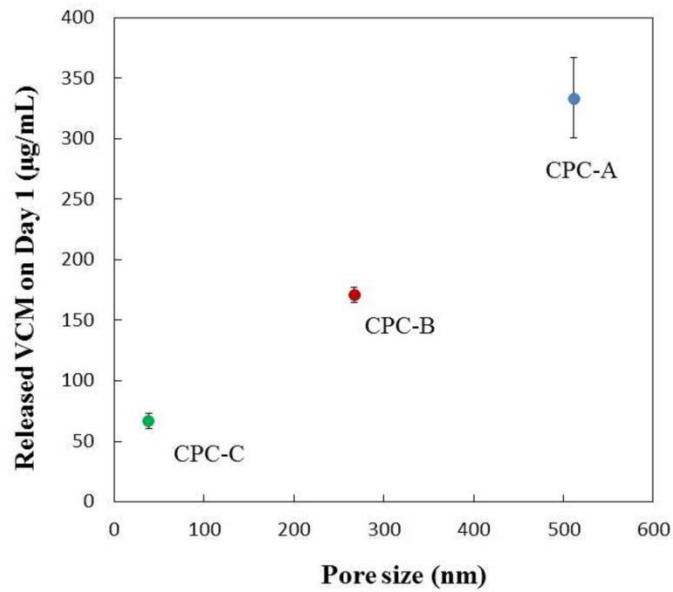


Fig. 2-17 Correlation between pore size of each test sample and VCM release

2.4.7. 力学的強度への影響

CPC はそもそも骨補填材であるので、DDS 基材として気孔構造を制御した際の力学的強度に与える影響は検証しておく必要がある。セラミックス材料中に気孔が存在するとき、それらは応力集中源となるため強度が低下することが知られており³⁴、以下の関係式 Eq. 2-4 で表される³⁵。

$$\sigma_f = \sigma_o \exp(-bp) \quad (\text{Eq. 2-4})$$

このとき、 σ_o は気孔が存在しない場合の強度、 p は気孔率、 b は定数を示す。さらに Knudsen らは、強度の支持体である気孔壁を形成する粉体の粒径にも着目し、以下の関係式 Eq. 2-5 を報告した³⁶。

$$\sigma_f = kD^{-a} \exp(-bp) \quad (\text{Eq. 2-5})$$

このとき、 k 、 a は定数、 D は粒径である。ここでの粒径とは、CPC で言えば原料粉体を指し、Eq. 2-5 によれば、原料粉体の粒径が大きいほど、強度は低下する。さらにこれを実験的に証明するため、上記3試料、CPC-A、CPC-B、CPC-C を用いて強度試験を行った。粉液比 (12 g/2.6 mL)の割合で練和し、モールドを用いて円柱状 ($\phi 7 \text{ mm} \times h 14 \text{ mm}$)に成形した。擬似体液に浸漬後 8 h における圧縮強度を、クロスヘッドスピード 0.5 mm/min で測定した。その結果、圧縮強度は、確かに気孔径および薬物放出とは負の相関を示した (Fig. 2-18)。材料が気孔でスカスカになるほど脆くなるというリーズナブルな結果ではあるが、より実用的には薬物放出、強度、両者を満たす気孔条件、例えば Fig. 2-18 中のグラフが交差する付近の条件などが該当すると考えられるが、いずれにしても、目的とする物性から逆算した材料設計が可能であることが示唆された。

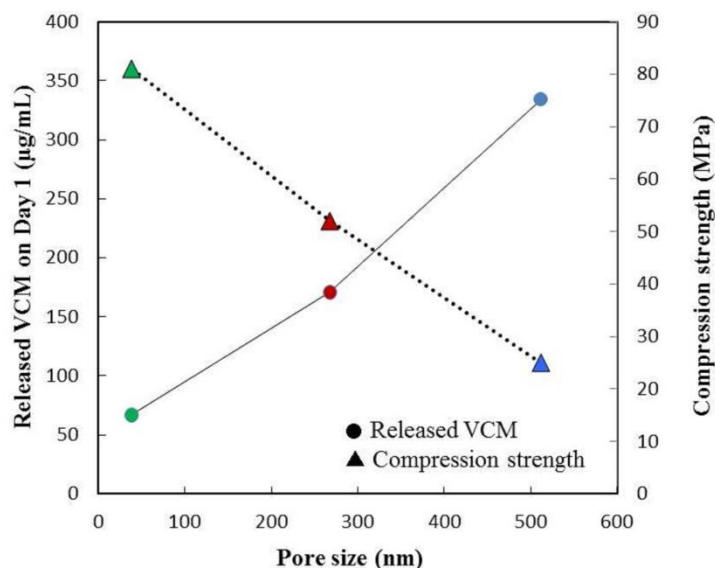


Fig. 2-18 Relationship between compression strength and drug release showing negative correlation

2.4.8. 粉末抗菌薬の挙動

セクション 2.4.6.では、CPC の気孔構造と薬物放出に高い相関があることを示した。ではなぜセクション 2.4.5.で述べたように、粉末抗菌薬のみが、その添加によって CPC の気孔径を顕著に増大させるのだろうか。実際は気孔径だけではない。VCM などの粉末抗菌薬の添加は、CPC の硬化時間を遅延させ、圧縮強度を低下させることが報告されているが、GM などの液体抗菌薬の添加は、大勢に影響は与えない場合が多い³¹。

Fig. 2-19 は、VCM 10 mg を、CPC 専用液剤と GM の比率を変化させた混合溶液 0.5 mL に溶解し

た際の様子である。これによると、CPC の粉剤と共にペーストを成している状態では不明瞭だったのだが、VCM は CPC 専用液剤には完全には溶解せず、ダマのような状態になった (f)。しかしながら、GM の混合比を上げ、CPC 専用液剤が希釈されると、VCM はしだいに溶解するようになった (a, b)。これは、CPC 専用液剤には、反応性や操作性を向上させる目的で、sodium succinate や sodium chondroitin sulfate などの糖類や塩類が相当量添加されているため、VCM の溶解が飽和状態にあり、それが希釈されることで溶解する余地が生じるためであると考えられた。VCM の添加は、CPC の硬化やその他反応性自体に影響は与えていないことから (Fig. 2-10)、CPC の粒成長の際に気孔の間隙を広げる物理的障害物のように振る舞い、結果として添加する抗菌薬の種類や数によって気孔径、ひいては薬物放出挙動が変化するという現象を引き起こすと考えられた。また上述のように、CPC の結晶レベルでは反応性に影響を与えなかったが、CPC の粒子間隙を広げることによる硬化時間の遅延、圧縮強度の低下を引き起こしたと考えられる。さらに VCM だけでなく、CPC 専用液剤に溶解しにくい他の粉末抗菌薬でも同様の傾向が観察されており、また、GM などの液体抗菌薬ではこの現象に従わないことから、本事象の考察は支持されることが考えられる^{26,37}。

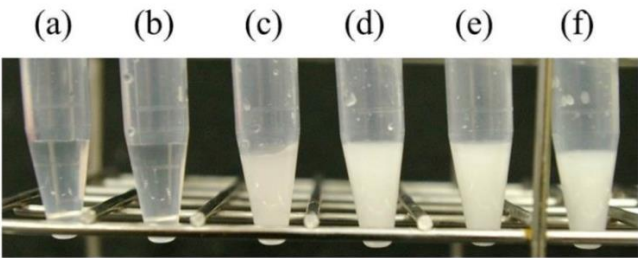


Fig. 2-19 The CPC dedicated solvent was diluted to 0%, 50%, 70%, 75%, 80%, and 100% with GM, corresponding to (a), (b), (c), (d), (e), and (f), respectively. Each 10 mg of VCM was added to 0.5 mL of the mixed solution.

2.5. 第 2 章のまとめ

以上、第 2 章で得られた知見を以下にまとめた。

Table 2-6 Summary of Chapter 2

	第2章	第3章	第4章
	無機材料	有機材料	無機－有機複合体
基材	リン酸カルシウム骨ペースト	ポリカプロラクトン (PCL)	磁性ナノ粒子－PCL複合体
薬剤	バンコマイシン ゲンタマイシン	パクリタキセル カルボプラチン	パクリタキセル カルボプラチン

- ・ CPC の薬物放出は、気孔構造の影響が極めて大きかった。
- ・ 内包する薬剤の種類や数によって気孔構造、放出特性が変わった。
- ・ 原料粉体の粒径に応じて気孔径を変化させることができ、薬物放出を制御できた。
- ・ 内包された薬剤と材料間の吸着相互作用、硬化反応への影響は低かった。

2.6. 参考文献

- 1 平野昌弘; 竹内啓泰; 浅岡伸之, リン酸カルシウム骨ペーストの開発. *Journal of the Society of Inorganic Materials, Japan* **2002**, 9, 44-50.
- 2 飯田高広; 松本一伸; 坂和明, 関節液中の抗生剤溶出濃度測定を行った抗生剤含有リン酸カルシウム骨ペーストを用いて治療した人工膝関節術後 MRSA 感染の一例. *Orthopaedic Ceramic Implants* **2008**, 27, 55-58.
- 3 Durbhakula, S. M.; Czajka, J.; Fuchs, M. D.; Uhl, R. L., Spacer endoprosthesis for the treatment of infected total hip arthroplasty. *Journal of Arthroplasty* **2004**, 19, 760-767.
- 4 Peersman, G.; Laskin, R.; Davis, J.; Peterson, M., Infection in total knee replacement: a retrospective review of 6489 total knee replacements. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **2001**, 392, 15-23.
- 5 Hanssen, A. D.; Rand, J. A.; Osmon, D. R., Treatment of the infected total knee arthroplasty with insertion of another prosthesis. The effect of antibiotic-impregnated bone cement. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **1994**, 309, 44-55.
- 6 Gooch, M. R.; Gin, G. E.; Kenning, T. J.; German, J. W., Complication of cranioplasty following decompressive craniectomy: analysis of 62 cases. *Neurosurgical Focus* **2009**, 26, E9.
- 7 Matsuno, A.; Tanaka, H.; Iwamuro, H.; Takahashi, S.; Miyawaki, S.; Nakashima, M.; Nakaguchi, H.; Nagashima, T., Analyses of the factors influencing bone graft infection after delayed cranioplasty. *Acta Neurochirurgica* **2006**, 148, 535-540.
- 8 DiCicco, M.; Duong, T.; Chu, A.; Jansen, S. A., Tobramycin and gentamycin elution analysis between two in situ polymerizable orthopedic composites. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2003**, 65, 137-149.
- 9 Kisanuki, O.; Yajima, H.; Umeda, T.; Takakura, Y., Experimental study of calcium phosphate cement impregnated with dideoxy-kanamycin B. *Journal of Orthopaedic Science* **2007**, 12, 281-288.
- 10 Niikura, T.; Lee, S. Y.; Iwakura, T.; Sakai, Y.; Kuroda, R.; Kurosaka, M., Antibiotic-impregnated calcium phosphate cement as part of a comprehensive treatment for patients with established orthopaedic infection. *Journal of Orthopaedic Science* **2016**, 21, 539-545.
- 11 網代泰充, 骨関節感染症に対する移植医療: 抗生物質含有リン酸カルシウムセメントの椎間板腔内移植で治療した脊椎インストゥルメンテーション術後感染の1例. *別冊整形外科* **2015**, 68, 79-83.
- 12 厚生労働省 院内感染対策サーベイランス事業, 手術部位感染 (SSI) 部門年報, **2017**.

- 13 日本化学療法学会; 日本感染症学会, *MRSA 感染症の治療ガイドライン—改訂版—2017*, **2017**, 70-86.
- 14 二木芳人, 抗 MRSA 薬の使い方, 使い分け. *日本内科学会雑誌* **2012**, *101*, 1085-1091.
- 15 Uchino, M.; Sugo, K.; Naruse, K.; Uchida, K.; Hirakawa, N.; Toyama, M.; Miyajima, G.; Urabe, K., Elution characteristics of vancomycin, gentamicin, and vancomycin/gentamicin combination from calcium phosphate cement. *Advances in Orthopedic Surgery* **2015**, *2015*, Article ID 257925.
- 16 塩野義製薬株式会社, 塩酸バンコマイシン点滴静注用 0.5 g. 添付文書.
- 17 日医工株式会社, ゲンタマイシン硫酸塩注射液 40 mg 「日医工」. 添付文書.
- 18 岡田雅人; 宮崎香, 改訂第 3 版 タンパク質実験ノート 下巻 分離同定から機能解析へ **2004**, 羊土社.
- 19 Dulbecco, R.; Vogt, M., Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *Journal of Experimental Medicine* **1954**, *99*, 167-82.
- 20 Urabe, K.; Naruse, K.; Hattori, H.; Hirano, M.; Uchida, K.; Onuma, K.; Park, H. J.; Itoman, M., In vitro comparison of elution characteristics of vancomycin from calcium phosphate cement and polymethylmethacrylate. *Journal of Orthopaedic Science* **2009**, *14*, 784-793.
- 21 Anhalt, J. P., Assay of gentamicin in serum by high pressure liquid chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1977**, *11*, 651-655.
- 22 Kadoya, T.; Isobe, T.; Ebihara, M.; Ogawa, T.; Sumita, M.; Kuwahara, H.; Kobayashi, A.; Ishikawa, T.; Okuyama, T., A new spherical hydroxyapatite for high performance liquid chromatography of proteins. *Liquid Chromatography* **1986**, *9*, 3543-3557.
- 23 Lundahl, P.; Watanabe, Y.; Takagi, T., High-performance hydroxyapatite chromatography of integral membrane proteins and water-soluble proteins in complex with sodium dodecyl sulphate. *Journal of Chromatography* **1992**, *604*, 95-102.
- 24 Sheu, M. T.; Huang, J. C.; Yeh, G. C.; Ho, H. O., Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. *Biomaterials* **2001**, *22*, 1713-1719.
- 25 杉山誠一; 糸数万正; 赤池敦; 野々村諭香; 清水克時, リン酸カルシウムセメントを使用した抗菌薬徐放システム. *整形外科* **2004**, *55*, 357-362.
- 26 Sugo, K.; Uchida, K.; Naruse, K.; Uchino, M.; Hirakawa, N.; Toyama, M.; Miyajima, G.; Ikeda, S.; Urabe, K., Elution mechanism of vancomycin and gentamicin from calcium phosphate cement. *Phosphorus Research Bulletin* **2016**, *32*, 1-4.

- 27 Higuchi, T., Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1963**, 52, 1145-1149.
- 28 大塚誠; 松田芳久, 自己硬化特性を有する生体活性セメントを用いた生体硬組織への薬物送達. *粉体工学会誌* **1995**, 32, 176-179.
- 29 Petrasch, J.; Meier, F.; Friess, H.; Steinfeld, A., Tomography based determination of permeability, Dupuit-Forchheimer coefficient, and interfacial heat transfer coefficient in reticulate porous ceramics. *International Journal of Heat and Fluid Flow* **2008**, 29, 315-326.
- 30 Vallabh, R.; Banks-Lee, P.; Seyam, A. F., New approach for determining tortuosity in fibrous porous media. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* **2010**, 5, 7-15.
- 31 Sugo, K.; Kawashima, R.; Nakasu, M.; Nakajima, T., Antibiotic elution profile and physical properties of a novel calcium phosphate cement material. *Journal of the Ceramic Society of Japan* **2016**, 124, 954-958.
- 32 吉田亮; 岡野光夫; 酒井清孝; 桜井靖久, ドラッグデリバリーシステム. *BME* **1990**, 4, 23-33.
- 33 菅生健; 川島良太; 中須正義; 中島武彦, リン酸カルシウム骨ペーストからの抗菌薬放出特性. *Journal of the Society of Inorganic Materials, Japan* **2019**, 26, 200-205.
- 34 宮田昇; 神野博, セラミックスの力学的性質 2. セラミックスの強度と破壊. *材料* **1983**, 32, 340-346.
- 35 Duckworth, W., Discussion of Ryshkewitch paper by Winston Duckworth. *Journal of the American Ceramic Society* **1953**, 36, 68-69.
- 36 Knudsen, F. P., Dependence of mechanical strength of brittle polycrystalline specimens on porosity and grain size. *Journal of the American Ceramic Society* **1959**, 42, 376-387.
- 37 高原俊介; 新倉隆宏; 李相亮; 岩倉崇; 新倉路生; 黒岩祐; 黒田良祐; 黒坂昌弘, リン酸カルシウムセメントを担体とした抗菌薬局所デリバリー—セファゾリン・ゲンタマイシンの溶出能評価—. *日整会誌* **2016**, 90, S1708.

第 3 章

有機材料を用いた薬物放出

3.1. 諸言

本章では、有機材料を用いた薬物放出としてポリカプロラクトン (PCL)を取り上げ、その薬物放出や相互作用を検証する。

3.1.1. PCL に着目した経緯

第2章で述べたように、筆者はこれまでリン酸カルシウム骨ペースト (CPC)などの無機材料を中心に研究開発を遂行してきたが、有機材料である PCL に着目した経緯を以下に述べる。

文献 No. 1 は、筆者もディスカッション等に参加した抗菌性人工股関節の開発および物性研究である¹。これは、力学的強度に優れるポリメチルメタクリレート (PMMA)セメントと、薬物放出に優れる CPC の相乗効果を得ることを目的として、CPC のコアに PMMA セメントを被覆した二層式のスペーサーであり、コアの CPC からの薬物放出効率を増大させるために、外側の PMMA 層からコアに貫通する孔を数か所開けることを特徴としている。本スペーサーを用いて、セクション 2.2.2. と同様の方法で薬物放出試験を行った結果を Fig. 3-1 に示した。これは内包された抗菌薬バンコマイシンの累積の放出量を示しているが、コアも含めてすべて PMMA セメントで作製されたスペーサーと比較して、コアを CPC にして二層式とするメリットが明確に示された結果である。

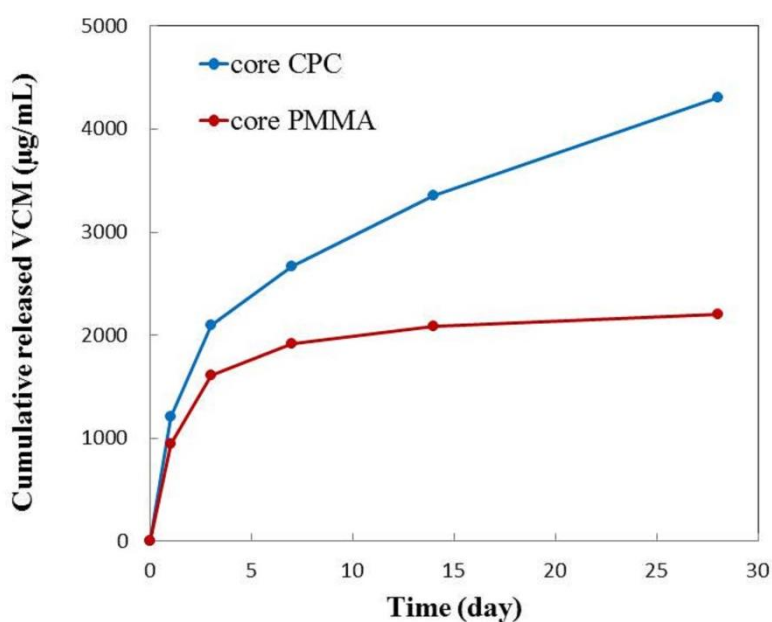


Fig. 3-1 Vancomycin elution profile using double-layered cement spacer

この結果を受け筆者は、PMMA 層に物理的な孔を開けなければならなかったことに、材料設計の観点から違和感を覚えていた。Fig. 2-16 では、CPC との比較のため、便宜上 PMMA セメントの細孔径分布も測定した。しかしながら、PMMA セメントをはじめとするポリマーには原則気孔という概念が存在せず、重合熱による発泡を気孔と表現する場合もあるが、それらは薬剤の放出を左右するほど連通したものではなく、一般的にはその非晶相からの染み出しという、CPC とはまったく異なる薬物放出機構を持つ。Table 3-1 に、各種ポリマーのガラス転移温度および結晶の融点を示した²。

Table 3-1 Transition temperature of each plastic²

Classification	Plastic	Glass-transition temperature (°C)	Melting point (°C)
Amorphous	Polyvinyl chloride	80	—
	Polystyrene	90	—
	PMMA	100	—
	Polycarbonate	145	—
	Polyethersulfone	190	—
Crystalline	Polyethylene	-125	141
	Polypropylene	0	180
	Polyamide 6	50	225
	Polyamide 66	50	265
	Polyacetal	-50	180
	Polyphenylene sulfide	88	290
	Polyetheretherketone	143	343

これによると、PMMA は非結晶性のポリマーであり、生体内環境ではガラス転移温度以下となってまったく流動性を示さず、内包された薬剤を放出するための基材としては不利な物性を有すると考えられた。したがって、有機高分子材料を用いて薬物放出を行う系においては、結晶性の制御およびモニターが不可欠であると考えられるが、薬物放出を劇的に実現できるほどの結晶性のアレンジや、温度などそのトリガーとなる刺激種、さらには生体に影響のない環境下で実施できるかまで考慮すれば、その可能性を有する有機材料は限られてくるであろう。以上のような経緯から、これらの条件を満たし、かつ将来的に CPC との複合化も視野に入れながら、本研究に適した有機材料の探索および関連技術等を調査・検証した結果を以下に述べる。

3.1.2. 生分解性ポリマー

医療用バッグ、カテーテル、シリンジ、手術器具、その他ディスポーザブル製品など、医療用プラスチックは現代の医療に無くてはならない存在となっている。中でも生分解性ポリマーは、生体内における酵素分解や加水分解により無害な化合物、最終的には二酸化炭素と水として排出されることを最大の特徴とする。医療分野においては、デンプンやセルロースなどの天然ポリマーよりも、生体適合性、生分解速度、機械的強度などを任意に調整できる合成ポリマーに注目が集まっており、代表的なものには外科用縫合糸として実用化されている、ポリグリコール酸やポリ乳酸などがある (Table 3-2)³。

3.1.3. ドラッグデリバリーシステム (DDS)分野での応用

生分解性ポリマーがその威力を発揮する領域の一つとして、DDS 分野が挙げられる。薬剤のカプセル化や薬物輸送としての用途はもちろんのこと、骨感染症による人工関節の再置換術においては、インプラントと共に骨セメントの摘出手術を行う場合が多く⁴、医師の手技や患者の負担を考慮すれば、そのまま吸収される材料の方が都合良いと考えられる。また、DDS 製剤の剤型の一種であるモノリシック型モデルにおいては (Fig. 3-2)、時間の経過と共に材料表層から薬剤の界面までの距

離が増大するため、薬物放出は時間の関数として減衰する^{5,6}。このとき、適当な時間軸で材料が外側から分解・吸収されていけば、理想的な0次放出が実現すると考えられる。

Table 3-2 List of chemically synthesized-biodegradable polymers³

Type	Application
Polylactic acid	Agricultural sheet, House film, Fiber products
Polybutylene succinate	Biomass, Non-rigid plastic
Polycaprolactone	Thermoplastic, Film
Polyvinyl alcohol	Vynlon fiber, Polarizing film
Polyglycolic acid	Suture thread, Non-woven materials
Polybutylene adipate terephthalate	Biomass
Modified polyethylene terephthalate	Fiber, Film, Bottle

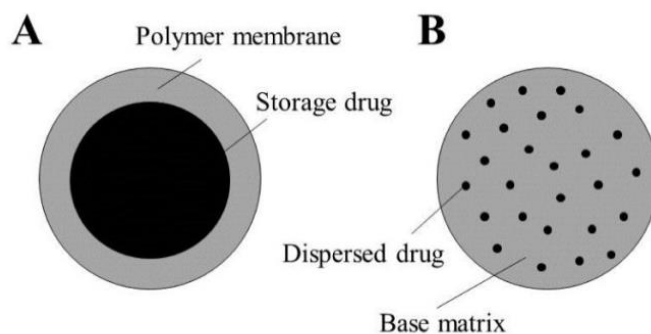


Fig. 3-2 Model of drug release control. (A) Reservoir type and (B) Monolithic type

3.1.4. スマートポリマーを用いた化学療法

3.1.4.1. PCL

スマートとは「賢い」を意味する言葉であるが、スマートポリマーとは一般的に、温度、pH、電気、光などの外部刺激に応答してその性質を変化させることができるポリマーを意味する⁷。すべてのポリマーがスマートになり得るポテンシャルを有しているが、医療用スマートポリマーとして実用化されるためには、その外部刺激が無害で、かつ術場において生体に対して与えやすく、さらにその外部刺激を境にポリマーの性質が劇的に変化するものである必要がある。上述した外部刺激の中では、とりわけ熱エネルギーの利用が正常組織に対する侵襲も低く、温熱療法が実用化されていることから、実現の可能性がもっとも高いと考えられる。

近年、ポリマーの結晶性を低下させ、結晶-非晶相転移を生体温度付近で行うことで、薬物放出を制御する技術が報告されている⁸⁻¹⁰。そのポリマーの素材のひとつに、PCLが挙げられる。PCLは、セクション3.1.2.で述べたように生分解性を有する半結晶性ポリマーで、米国食品医薬品局(FDA)認可の生体適合性材料としても知られている。モノマーであるε-カプロラクトン(CL)の開環

重合により容易に合成することができるが、PCL の生分解性などの性質は、分子内にエステル構造を有するこのモノマーの性質に由来しているとも言える。また、ラクトンとは環状エステルの総称であるが、四員環である β -プロピオラクトンなど炭素数の少ないものは毒性が強く¹¹、五員環の γ -ブチロラクトンはモノマーが極めて安定であるため開環重合せず、六員環の δ -バレロラクトンはポリマーの熱安定性が低いなどの理由から¹²、これらの問題を解決できる七員環構造の CL が機能性高分子の原料モノマーとして汎用されている。逆に十二員環以上の大環状ラクトンも知られているが、それらはポリマーよりも抗菌薬や抗がん剤などの基本骨格としての用途が有名である¹³。

その他、PCL の代表的な特徴の一つとして、融点の低さ (約 60°C) が挙げられる。それゆえ加工が容易であるだけでなく、ガラス転移点が約 -60°C という特徴からも、常温において柔軟かつ強靱であるという優れた性質を併せ持つ。さらに、材料設計の観点から言えば、合成時に分岐構造を導入することで結晶性および融点を低下させることが可能であり、また適当な架橋点を形成させることで形状記憶特性を付与することも知られている (Fig. 3-3)^{8,14}。本研究では、形状記憶ポリマーとしてのカテゴリーで PCL にフォーカスしている訳ではないが、目的温度に調整された融点を境にして、結晶-非晶相転移が劇的に起こり、内包している薬剤を効果的に放出することができるというその特筆すべき性質は、紛れもなく PCL の優れた形状記憶特性に起因していると言える。ちなみに、結晶性が低下すると融点が下がる理由としては、結晶性ポリマーには結晶部と非晶部が存在し、加熱・加温によるポリマーの熱運動の増大により、結晶部が破壊されて流動性を示すようになる温度が融点であることに寄る。結晶性が低ければ、それを融解するための熱エネルギーは少なく済み、結果として融点は下がると思われる。以上のような理由から、PCL は本研究に適している材料であると考えられた。

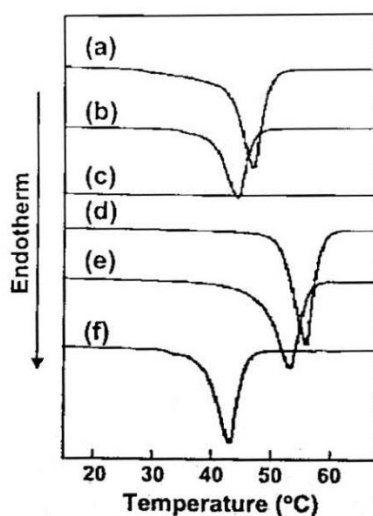


Fig. 3-3 Differential scanning calorimetry (DSC) charts of 4-branched and 2-branched various PCLs⁸. (a) 4b10, (b) 4b10-m, (c) cross-linked 4b10-m, (d) 2b20, (e) 2b20-m, and (f) cross-linked 2b20-m. The 4-branched and 2-branched PCLs contained 10 and 20 units of CL, and were abbreviated as 4b10 and 2b20, respectively. The corresponding reactive oligomers (macromonomers) were labeled as 4b10-m and 2b20-m, respectively. An increase of cross-linking density suppressed the chain mobility and reduced the crystallization of the PCL branches. Uto et al. suggested that the 4-branched PCL would mainly play a cross-linking role and the 2-branched one would be the sensitive temperature-responsive part.

3.1.4.2. 内包する抗がん剤

多剤併用療法を行う場合、ただ闇雲に組み合わせればよいというわけではなく、セクション 1.4.3. で述べたように、効果がプラスに作用し、90%以上の感受性を示すようになる組み合わせで選択される。本研究では、将来的な実使用に則した研究成果とするために、実際に臨床で使用されている組み合わせを採用しようと考えた。そこで今回、多剤併用療法の検証モデルとして選択したのが、パクリタキセル (PTX)、およびカルボプラチン (CBDCA)である。この2剤の併用療法は、一般的に両者の頭文字 (Taxol および Carboplatin)を取って TC 療法と呼ばれており、卵巣がん治療における標準化学療法として適用されている。

PTX (Fig. 3-4A)は、タイヘイヨウイチイの樹皮を起源とするタキサン系の抗がん剤で、腫瘍細胞の微小管に特異的に結合することにより分裂を阻害する (Fig. 3-5A)¹⁵。約20年前に筆者が学士課程の学生だった当時は、商品名であるタキソールと呼ぶのが一般的で、イチイの大量伐採が危惧されたこともあり、当時の東京理科大学・向山光昭教授や椎名勇氏 (現教授)など、世界有数の有機合成家らが、精力的にその全合成に取り組んでいた¹⁶。患者1人分の治療あたり、樹齢200年のイチイの大木6本を要するとも言われてきたが、現在は、ヨーロッパイチイより抽出した中間体バッカチンⅢを原料にして合成されている。PTXは極めて疎水性が強く、製剤中にはpolyoxyethylene castor oil、dehydrated ethanolが含有されている。そのため、それら添加物由来の副作用にも注意が必要で、例えばTC療法1クールスケジュールでは、抗アレルギー剤や制吐剤の投与が、抗がん剤投与に先立って行われる。中でも特徴的な副作用として、dehydrated ethanolによるアレルギー、眠気、頻脈など、酒類を飲んだ時のような症状が知られているが、1回のPTX投与は、ビールコップ1杯 (200 mL)からジョッキ1杯 (500 mL)にも相当するため、アルコールに弱い患者や治療後の車の運転などには注意が必要である¹⁷。

一方CBDCA (Fig. 3-4B)は、白金製剤であるシスプラチンの副作用、腎毒性を軽減するために開発された。作用機序はシスプラチンと同様、細胞内で Fig. 3-4B 左側の構造 1,1-cyclobutane dicarboxylic acid が水に変換されることで脱離および活性化し、DNAの構成塩基であるグアニン、アデニンのN-7位に結合することでアポトーシスを誘導する (Fig. 3-5B)¹⁸。抗がん剤の投与量は一般的に患者の体表面積で計算されるが、CBDCAの場合はクレアチニンクリアランスと相関があり、体内の薬物量 AUC を用いて決定される。また、投与量を増やしても効果が頭打ちになることでも知られ¹⁹、より効果的と言われるdose-dense TC療法 (後述)でもdoseを増やすのはPTXのみである。

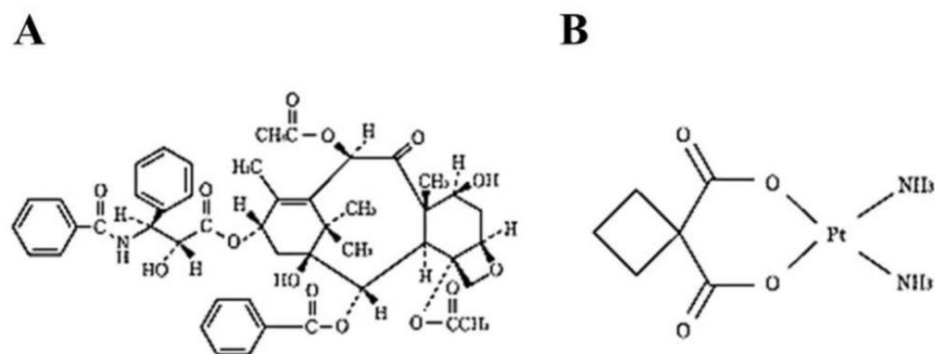


Fig. 3-4 Molecular structure of (A) PTX²⁰ and (B) CBDCA²¹

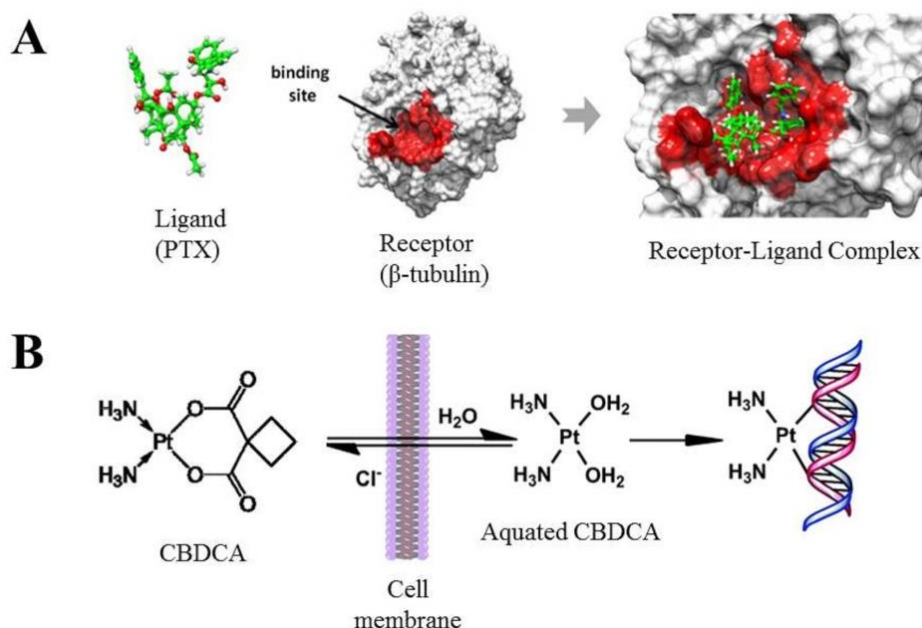


Fig. 3-5 Functional mechanism of PTX¹⁵ and CBDCA¹⁸

3.1.5. TC 療法について

本研究において検証モデルとして採用する卵巣がん標準化学療法、TC 療法について簡単に触れておく。卵巣がんは患者数こそ少ないものの、死亡率が婦人科系ワーストであるばかりでなく、主要5部位（大腸、胃、肺、肝臓、乳房）と比較しても極めて予後が悪いことで知られる²²。一般的に卵巣がんは、化学療法への感受性が良好な腫瘍と考えられているが²³、その組織型により奏効率が異なる。Table 3-3 に、2000 年代前半に報告された tri-weekly (3 週ごと) TC 療法に対する組織型別の奏効率を示す²⁴。これによると、粘液性腺がんや明細胞腺がんにはほとんど効果がないことが示され、これが卵巣がんの高い死亡率と予後の悪さを引き起こしている原因と考えられた。組織型により奏効率が異なる理由は明らかではないが、各組織における細胞の分化度 (grade) の違いが大きく関係していると考えられている²⁵。分化度とは、がんが正常の細胞とどの程度かけ離れているかを表す指標で、高分化の場合は比較的もとの組織に類似しているが、低分化あるいは未分化と呼ばれるがんになると、もとの組織とはかけ離れた組織像を呈するようになる²⁶。例えば、心臓に原発する腫瘍は少なく、全剖検例の 0.1% 以下と集計されており、中でも悪性腫瘍は約 25% である²⁷。心臓に悪性腫瘍の発生が少ない理由として最も有力とされているのが、この分化度の違いである。心臓は横紋筋という特殊な筋肉とその間にある結合組織や血管からできているが、分化の進んだ細胞である横紋筋は細胞分裂を引き起こさない。このように高度に分化した心筋細胞からなる心臓は、細胞の異常増殖の病気であるがんや肉腫を発生しないとされている²⁷。この分化度の違いを一般的に悪性度と呼び、上述したように発生部位により異なる。悪性度とは、がんの成長、増殖、周辺臓器への浸潤、遠隔転移などの度合いを意味し、それらは直接余命を左右する。加えて、悪性度の高いがんは検査で初めて発見されたときには既に進行している場合が多く、卵巣がんのように、患者数の割には死亡率が極端に高いという傾向も特徴のひとつである。

Table 3-3 Response for tri-weekly TC Therapy²⁴

Histology	Response
Serous	81%
Endometrioid	89%
Mucinous	13%
Clear cell	18%
Others	75%
Serous: 漿液性腺がん	Endometrioid: 類内膜腺がん
Mucinous: 粘液性腺がん	Clear cell: 明細胞腺がん
Others: その他	

ちなみに奏効率とは、がん治療の効果を判定する指標で、治療後の腫瘍の大きさを、完全奏効 (complete response; CR)、部分奏効 (partial response; PR)、安定 (stable disease; SD)、進行 (progressive disease; PD) に分類し、CR と PR の割合を合算して奏効率と呼ぶ²⁸。奏効率 20% 以上を効果のある治療法と判定し、通常 SD は奏効率に含めない。SD も奏効率に含めてあかかも治療効果が高いかのように見せる広告などには注意が必要である。しかしながら 2009 年、婦人科悪性腫瘍化学療法研究機構が行った、従来の tri-weekly TC 療法と新しい weekly (dose-dense) TC 療法のランダム化比較試験の結果、後者で有意に無増悪生存期間の延長が認められたため²⁹、この dose-dense TC 療法が、2012 年に標準化学療法として加えられた。

Dose-dense という考え方は比較的歴史が深い。1825 年 Gompertz は、人の死亡率は年齢と共に S 字曲線を描くことを提唱した³⁰。これはゴンペルツ成長曲線と呼ばれ汎用性が高く、生物学的な増殖に関しても、正常組織か悪性腫瘍かに関わらず、この理論に従うと推測された (Fig. 3-6)。すなわち、固形がんでは、腫瘍は増大するにつれて増殖速度は鈍くなり、増殖期にある細胞の割合も減少してくることを示している。

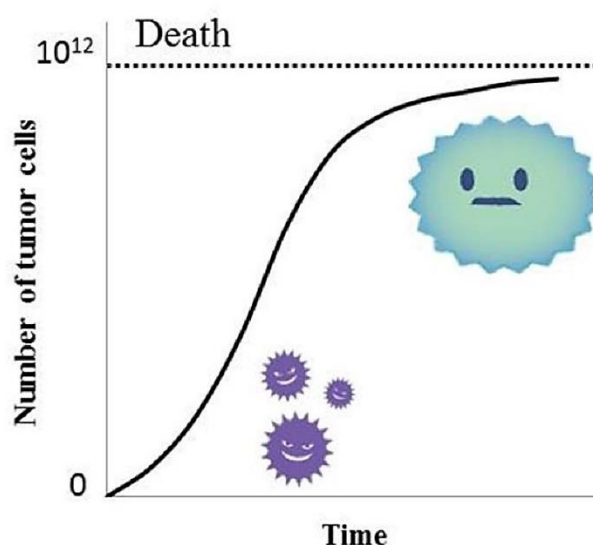


Fig. 3-6 Gompertzian growth curve

その後、1977 年 Norton は、乳がん腫瘍細胞の増殖がこのゴンペルツ曲線に従うと報告し、Simon と共に dose-dense 化学療法という理論を提唱した^{31,32}。これは、1 クールの化学療法で縮小した腫瘍細胞が再び増殖してくる前に、抗がん剤の投与量を減らし、投与間隔および休薬期間を短くして投与するべきであるという投与スケジュールに関する理論であり、結果的に総投与量を増やすことができる (Fig. 3-7)。この理論が、乳がん治療および卵巣がん治療において有効であることが日本でも証明され、PTX の 1 回の投与量を半分以下に減量して毎週 (weekly) 投与する、dose-dense TC 療法が標準化学療法として確立したのである。

Dose-dense、つまり投与間隔を短縮し、総投与量を増やすことで効果が得られるのであれば、スマートポリマーを用いた多剤併用局所療法は、究極の dose-dense 療法であると言っても過言ではない。以上のような背景から、この TC 療法に代表される多剤併用療法をスマートポリマーで実現することができれば、極めて有意義であると考えられた。

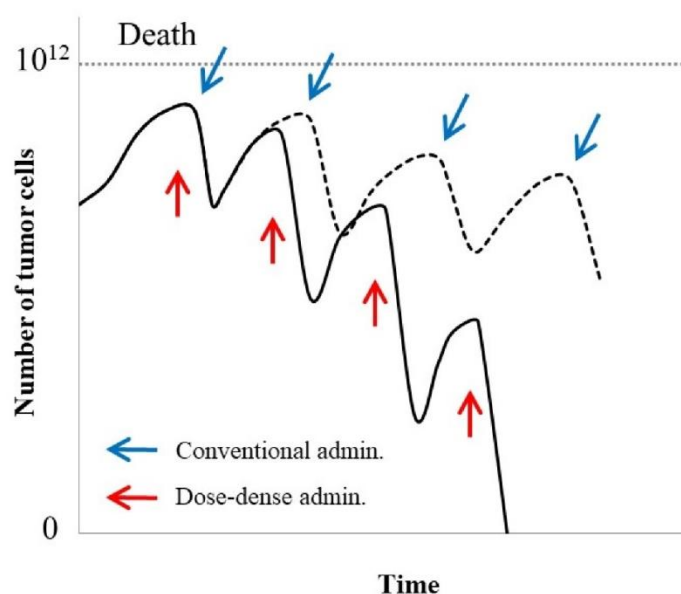


Fig. 3-7 Theory of dose-dense therapy

3.2. PCL スマートフィルムの作製

スマートポリマーを基材として得られる医療材料の形態は、メッシュ^{9,10}、フィルム³³、粒子³⁴など様々であるが、例えばメッシュの場合は、電圧などエレクトロスピンニングの条件検討だけでもかなりの時間を要すると考えられ、また安定した製造方法が確立しているという理由から、本研究では、スマートフィルムを選択した。以下にその作製方法と物性評価の結果を述べる。

3.2.1. 実験

3.2.1.1. 試薬

本章で使用した試薬および装置のリストを下記に示す。

Table 3-4 Reagent list used in this section

Reagent	Abbreviation	Company	Location
1,4-Butandiol	—	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
ϵ -Caprolactone	CL	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Tin (II) 2-ethylhexanoate	—	Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
Tetrahydrofuran	THF	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Diethylether	—	Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
Hexane	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Triethylamine	TEA	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Acryloyl chloride	—	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd	Tokyo, Japan
Methanol	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Paclitaxel	PTX	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd	Tokyo, Japan
Carboplatin	CBDCA	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd	Tokyo, Japan
Benzoyl peroxide	BPO	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
N,N-dimethylformamide	DMF	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan

Table 3-5 Experimental device list used in this section

Device	Model	Company	Location
Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	JNM AL-300	JEOL Ltd.	Tokyo, Japan
Gel permeation chromatography (GPC)	—	JASCO International Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Thermo gravimeter (TG)	TG/DTA 6200	Seiko Instruments Inc.	Chiba, Japan
Alternating magnetic field (AMF)	HOT SHOT 2	Ameritherm, Inc.	New York, NY, USA
IR-thermo camera	CPA-E6	FLIR Systems Japan K.K.	Tokyo Japan
Differential scanning calorimetry (DSC)	Thermo plus EVO2 DSC8231	Rigaku Corporation	Tokyo, Japan
High-performance liquid chromatography (HPLC) column	CAPCELL PAK C18 UG120	Osaka Soda Co., Ltd.	Osaka, Japan

HPLC device	Elite LaChrom	Hitachi High-Technologies Corporation	Tokyo, Japan
Spectrophotometer	UV-1800	Shimadzu Corporation	Kyoto, Japan

3.2.1.2. PCL の合成

PCL および PCL macromonomer の合成反応式を Fig. 3-8 に示した。1,4-Butandiol (1.917 mL, 21.5 mmol) を 200 mL 用丸底フラスコに投入し、2 hr 減圧脱水した。窒素フロー下で CL (95 mL, 899 mmol) および触媒として Tin(II) 2-ethylhexanoate (約 30 滴) を添加し、120℃、24 hr 反応させた。Tetrahydrofuran (THF) 約 300 mL を加え反応物を溶解し、4 L 用ビーカーに調製した diethylether 1.75 L / hexane 1.75 L へ投入して、再沈殿させることで精製した。核磁気共鳴装置 (NMR) およびゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) により、合成した PCL の構造および分子量を同定した。

3.2.1.3. PCL マクロモノマー化

セクション 3.2.1.2. で合成した PCL 約 50 g (10.2 mmol) を 1 L 用ナスフラスコに投入し、THF 300 mL を添加して溶解した。Triethylamine (TEA) 10 mL (70.5 mmol) に次いで、氷冷、撹拌しながら acryloyl chloride 4.73 mL (57.3 mmol) を添加し、そのまま 24 hr 撹拌した。2 L 用ビーカーに調製した methanol 1.5 L へ投入し、5 回再沈殿させることで精製した。NMR により、合成した PCL macromonomer (PCL-m) の末端ビニル基導入率を算出した。

3.2.1.4. PCL フィルムの合成

セクション 3.2.1.3. で合成した PCL-m、および benzoyl peroxide (BPO)、PTX、CBDCA、N,N-dimethylformamide (DMF) を Table 3-6 の割合で混合および懸濁し、幅 5–10 mm、内寸 50 mm × 50 mm × 0.2 mm のテフロンフレームを敷いたガラス板に流し込んだ。もう 1 枚のガラス板ではさみ、オーブンに設置して 80℃、3 hr 重合させた。完成した PCL フィルムは、内包した薬剤の漏出を防ぐために洗浄工程は行わず、φ5 mm にくり抜き、in vitro 薬物放出試験に備えた (Fig. 3-9)。ちなみに、Table 3-6 に記載のフィルム No. は、以降本論文で一貫して使用する。

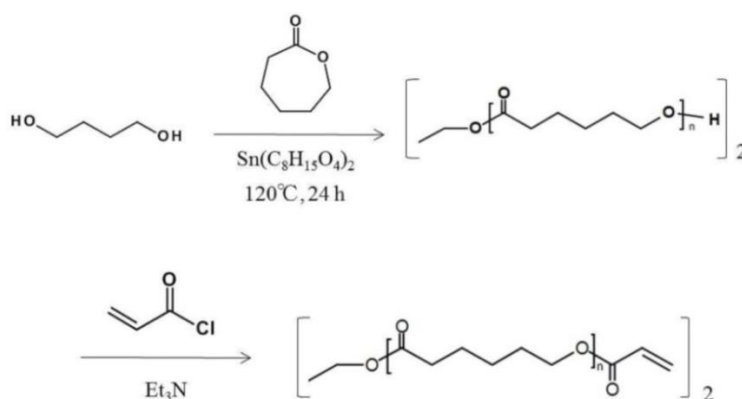


Fig. 3-8 Fabrication of PCL and PCL-m

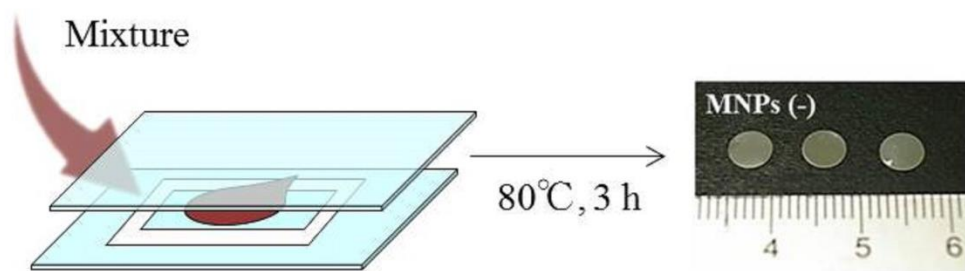


Fig. 3-9 Preparation of cross-linked PCL

Table 3-6 Composition list of PCL film

No.	PCL-m (mg)	BPO (mg)	PTX (mg)	CBDCA (mg)	DMF (μ L)
1	588.0	12	—	—	625.5
3	576.2	12	12	—	613.0
5	576.2	12	—	12	613.0
7	564.5	12	12	12	600.5

3.2.2. 結果と考察

3.2.2.1. PCL の構造評価

セクション 3.2.1.2. で得られた PCL の構造に関して、 CDCl_3 中で $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定を行った (Fig. 3-10)。各 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルのシグナルと積分値の同定を行い、シグナル e (termini) に対するシグナル c の比を算出したところ、19.8H が得られた³⁵。したがって、約 20 量体の PCL を 1,4-butandiol が連結したリニアポリマーで、また GPC の結果から分子量約 4,900 を有する PCL を合成することができた。

本 PCL の合成で使用されている 1,4-butandiol は、開環重合の開始剤であり、また PCL 骨格を連結する重要な役割を担っている。1,4-Butandiol のような水やアルコールの水酸基は、その非共有電子対を介して、CL のカルボニル炭素を求核攻撃する。しかしながら、これら中性の求核剤は、塩基性の強い、例えばフリーの水酸化物イオンほどの求核性は持っておらず、そのままでは CL を開環することができない。そのため触媒として、オクチル酸スズ (Tin(II) 2-ethylhexanoate) が用いられる。スズ原子は CL のカルボニル炭素に配位してカルボニル基を活性化する。このときカルボニル炭素が極めて陽性化されるため、1,4-butandiol 水酸基による求核攻撃および開環重合が進行するようになる。スズが触媒として用いられる背景には、金属触媒の分子内エステル交換反応活性を、 $\text{Sn} > \text{Zn} > \text{Zr} > \text{Ti} > \text{Al}$ とした、Noda らの報告がある³⁶。オクチル酸スズは、FDA で認可されている重合触媒で、特にラクトン類との相溶性、低毒性、高い触媒効果、光学純度の低下が少ないなどの理由から、ラクチドや環状エステルの開環重合に汎用されている^{37,38}。

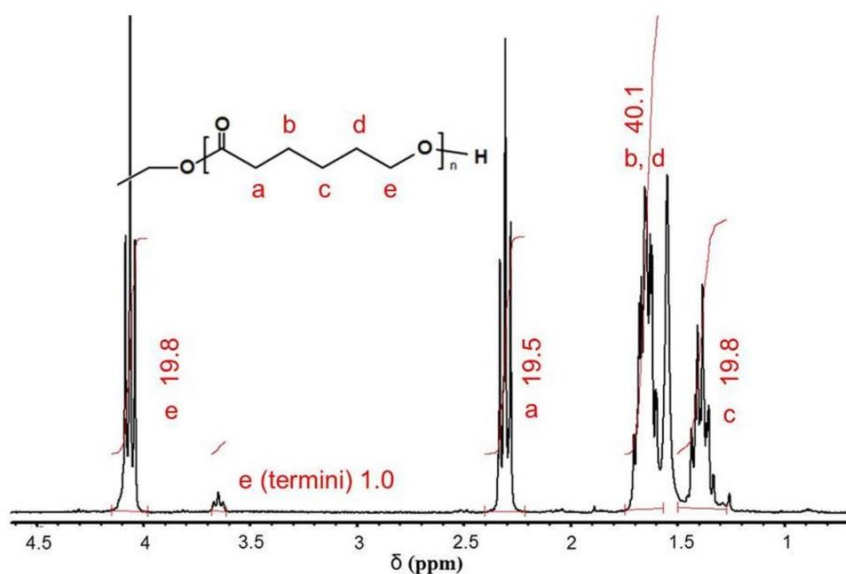


Fig. 3-10 ^1H -NMR spectrum of PCL

3.2.2.2. PCL-m の構造評価

セクション 3.2.1.3. で得られた PCL-m の構造に関して、 CDCl_3 中で ^1H -NMR スペクトルの測定を行った (Fig. 3-11)。各 ^1H -NMR スペクトルのシグナルと積分値の同定を行い、シグナル c を 40H と仮定した際のシグナル g, h, i の総和を算出したところ、2.74H が得られた。ビニル基導入率 100% の理論値が 3H であることから、末端ビニル基導入率 91.3% の PCL-m を合成することができた。

本 PCL-m の合成における acryloyl chloride と PCL の反応も、セクション 3.2.2.1. と同様に、PCL の末端水酸基が acryloyl chloride のカルボニル炭素を攻撃する、典型的な求核アシル置換反応、または変形の Schotten-Baumann 反応といえる^{39,40}。反応系には TEA が添加されているが、反応により生成した H^+ を中和する目的であると、一般的には理解される。広義には中和反応かもしれないが、TEA の作用を単なる中和と考えてしまつては、本反応の醍醐味が半減してしまい、なぜ系を中和しなければならないかを考慮することが重要である。この場合、 H^+ の動きに注意が必要で、脱離した H^+ は PCL の末端水酸基が受け取り、 $-\text{OH}_2^+$ となる。プロトン化された水酸基は求核性を失うため、その結果このマクロモノマー化反応は停止してしまう。そのため、それよりも先に H^+ をトラップすることができる塩基性物質を系に十分量加えておく必要があり、その役割を担うのが TEA なのである。しかしながら、TEA の非共有電子対は、PCL の水酸基よりも先に acryloyl chloride と反応する危険性もあるため (この場合もマクロモノマー化は起こらなくなる)、acryloyl chloride を添加する前に、PCL と TEA は、あらかじめ十分混合攪拌しておくことで、本マクロモノマー化反応の成功率が向上することが当研究室の経験則として知られている。この経験則はまだ化学的に検証されていないが、PCL と TEA をプレインキュベーションすることで、PCL の末端水酸基が脱プロトン化して $-\text{O}^-$ の活性型となり、求核性が増強した状態で acryloyl chloride を添加するというひと手間が、本反応の成功率向上につながっているのではないかと考えられる。

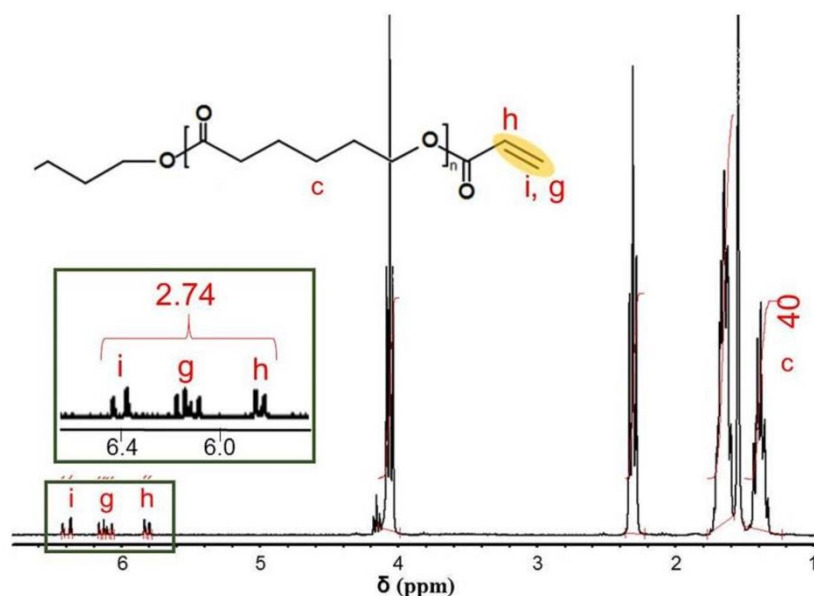


Fig. 3-11 ^1H -NMR spectrum of PCL-m

3.3. PCL フィルムの物性評価

3.3.1. 融点検証

3.3.1.1. 実験

セクション 3.1.4.1.で述べたように、本 PCL フィルムの薬物放出を制御するキーファクターは、結晶性および融点の低下である。最終的に得られた PCL フィルムの融点を、DSC を用いて検証した。装置の試料室内を約 0°C まで冷却し、昇温速度 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 、目標温度 100°C で測定を開始した。フィルム作製前の PCL や PCL-m をコントロールとして用いた。

3.3.1.2. 結果と考察

Fig. 3-12 に、DSC 分析の結果を示した。これによると、PCL フィルムの吸熱ピーク、つまり融点は、生体内温度に近い 40°C 付近に調整されていることが示された。フィルム重合前の PCL や PCL-m の融点は高いままであったことから、部分的な架橋点を導入したことにより結晶性および融点を低下させることに成功したと考えられる。

セクション 3.1.4.1.および Fig. 3-3 で示したように、PCL の重合度や分岐構造、またそれぞれに対応する架橋後のポリマーの結晶性や相転移温度との相関はこれまでも報告されており^{8,14}、生体内での薬物放出をターゲットとした場合、生体内温度付近に融点を調整する必要があるが、そのためには、PCL は 20 量体かつリニア構造 (2 branch) で設計するべきであるという戦略が確立している。やや逆説的ではあるが、本研究における PCL はその既報をリファレンスとして合成され、得られた PCL フィルムの構造や熱挙動がここに確認された。

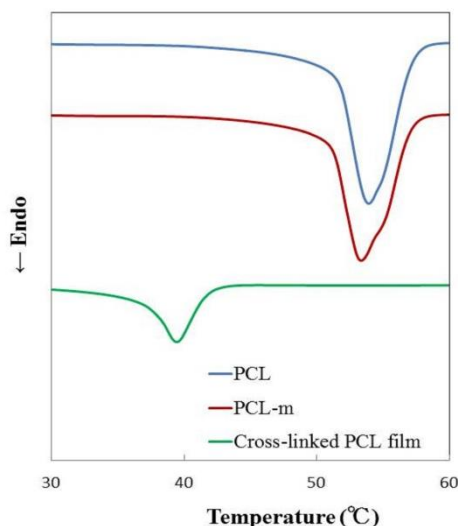


Fig. 3-12 DSC analyses of various PCL materials

3.4. 薬物放出試験

3.4.1. 薬剤分析方法

3.4.1.1. 吸光光度法

分析対象となる薬剤の種類や構造、分子量などによって、その分析方法は多岐にわたる。本研究における分析対象である PTX および CBDCA は、共にイオン性に乏しく、分子量も 1,000 以下で大きな違いはないことから、GPC を用いての分析も難しいと考えられた。反面、Fig. 3-4 で示した両薬剤の分子構造、特に π 電子を有する芳香環やエステル構造などを有することから、特異的な紫外吸収スペクトルを示すと考えられるため、一般的な分光光度計で定量することは可能と思われた。そこで、70% methanol を用いて調製した 0.5 mg/mL PTX、およびリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて調製した 0.5 mg/mL CBDCA の紫外-可視吸収スペクトルを測定した。

3.4.1.2. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)法

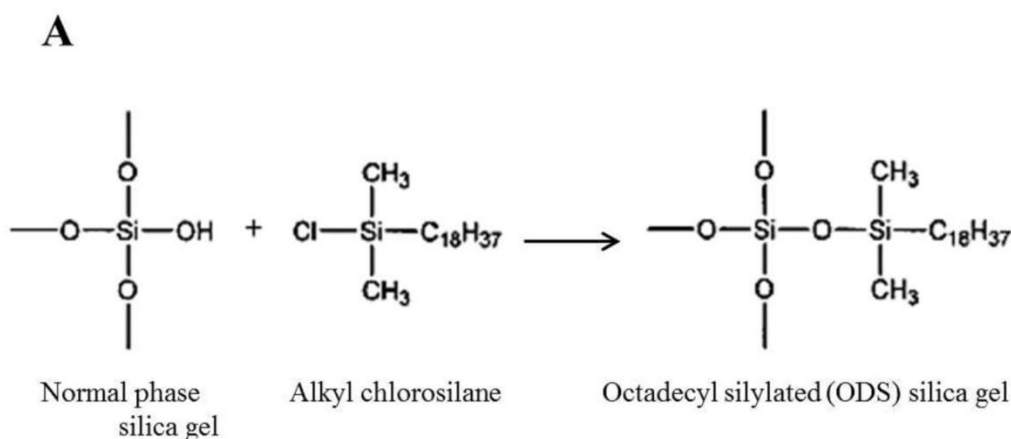
両薬剤が疎水性基を有することに着目し、オクタデシルシリル化シリカゲル (ODS)カラムを用いた HPLC 法を検証した。いわゆる逆相モードに分類される ODS は、球状シリカゲル粒子にオクタデシル基 (C18)を被覆した表面構造を有し、分析対象物質を疎水性相互作用の小さいものから大きいものへと順に、分離、検出することを可能にする。逆相と呼ばれる所以は、1903 年 Tswett が報告した CaCO_3 カラム (高極性)とエーテル系移動相 (低極性)を用いた葉緑素の分離に端を発する⁴¹。このような、シリカなど固定相の極性が移動相よりも高い場合の分離モードを順相と呼ぶ⁴²。しかしながら、当初から順相という名称で呼ばれていたわけではなく、1969 年頃から ODS が登場し始めると⁴³、固定相の極性が移動相よりも低い、それまでとは全く逆の分離モードを有するカラムという意味で、先に存在した方を順相、後から登場した方を逆相と呼ぶようになった。

順相カラムは、官能基の付かないシリカゲルや、アミノプロピル基を結合させたシリカゲルなどが知られている (Fig. 3-13A)。このシリカゲル表面は、 $-\text{Si}-\text{OH}$ のような化学処理が施されており、

分析対象物質の水酸基やアミノ基との間に発生する親水性相互作用により、異性体や構造の類似した物質の分離、糖類および抗がん剤であればシスプラチンなどの分析に利用される^{44,45}。親水性相互作用とは、水素結合や静電相互作用を意味するが、順相クロマトグラフィーの主たる原理は、分析対象物質における、固定相と移動相の間の分配の制御に基づいている。つまり、移動相には通常極性の低い hexane や chloroform などが用いられるが、極性の高い ethanol などのアルコール類、場合によっては水の添加率を変えることで、溶出の速度を制御することができる。分析後の系に水がほとんど含まれていないことから、分析対象物質の加水分解の抑制や、濃縮、乾固が容易であるなどのメリットがある。しかしながら、大量の有機溶媒の排水が出るなどの問題もあり、逆相モードへのシフトが検討されるなど⁴⁶、一般的な分離・分析の汎用性としては逆相カラムにその座を譲っていると言える。

一方で逆相カラムは、上述したように疎水性相互作用を利用した分離モードであるが、最大の特長は、移動相として水と methanol、acetonitrile などの有機溶媒との混合溶液を用いることが出来る利便性と、その混合比率を変化させたグラジエント溶離によって、分離の向上や測定時間の短縮を実現できることであると考えられる。上述した順相シリカゲル表面を、長鎖アルキルクロロシランを用いて化学修飾することによって製造することが可能で (Fig. 3-13A)、C18 基以外にも、アルキル鎖長の異なる官能基 (C8 など) が結合された製品も存在する。また、逆相カラムの性能を左右する要因として、官能基の置換率、そしてエンドキャップの有無が挙げられる。官能基の置換率とは文字通り相互作用の場を示し、改めて言及する必要もないと思われるが、重要なのは、官能基の未置換部分、いわゆる残存シラノール基が化学処理によってマスキングされているかどうかである。このマスキングをエンドキャッピングと呼び、主にトリメチルシリル (TMS) 基がその処理に用いられる (Fig. 3-13B)^{47,48}。これにより、特に塩基性化合物の保持力や非特異相互作用などを改善することが可能となるが、逆に残存シラノール基の吸着作用を利用する分析手法も存在するため⁴⁹、敢えてエンドキャップをしていない製品もあり、目的に応じたカラムの選択が必要不可欠であると考えられる。いずれにしても、逆相カラム、特に ODS は物理的、化学的にも安定であり、抗がん剤をはじめ多くの薬剤が疎水性基を有することからも汎用性が高く、HPLC 技術を広く普及させる一因となった⁴⁸。

そこで、PTX および CBDCA の分析方法を確立するため、70% methanol を用いて調製した両薬剤、それぞれ 0.5 mg/mL の混合溶液を HPLC で分析した。カラムは、CAPCELL PAK C18 UG120 (5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm) を、HPLC 装置 Elite LaChrom に装着して用いた。移動相は acetonitrile 0-80% のグラジエントとし、上述の混合溶液 20 μ L を流速 1.0 mL/min で注入した。カラムオーブンは 30°C に維持し、吸光度 230 nm にて検出した。また、ピークの帰属のために混合溶液ではなく、PTX および CBDCA それぞれ単独で分析した結果と比較した。



B

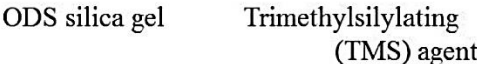


Fig. 3-13 (A) Octadecylation of silica gel⁴⁷ and (B) end-capping method after octadecylation⁵⁰

3.4.2. In vitro 藥物放出試験

セクション 3.2.で作製したスマートフィルムを、24 well マイクロプレートに 1 枚ずつ設置し、PBS を 2 mL/well 添加した。マイクロプレートのフタを被せ、隙間をパラフィルムで養生し、37℃に静置した。PBS は半量 1 mL を実験開始 1 日、2 日、3 日、4 日、7 日、14 日、21 日、28 日に回収し、その都度新しい PBS 1 mL を添加した。回収液中の薬剤濃度をセクション 3.4.1.2.で述べた HPLC 法で測定し、以下の計算式 Eq. 3-1 により薬剤仕込み量を 100%として、累積の徐放率としてまとめた。

ここで、外液 PBS の交換を半量 1 mLで行うことの意義について触れておく。薬物放出等、物質の拡散に関する基本法則であるフィックの法則によると、物質の拡散流速は濃度勾配に比例する。したがって、薬物放出を効率よく行うためには、またそれを正確に評価するためには、外液は無限希釈もしくは頻繁な液交換が必要となる。しかしながら、試験容器中の (well 中の)すべての溶液を交換した場合、容器中に残存する液滴、特にフィルム等材料周囲に付着した液滴を新たに交換した溶液中に持ち込んでしまうことになり、次の回収液中の測定値は正確な値を示さない。例えばこの時、試験容器を都度新しいものに交換することは構わないと考えられるが、フィルム等材料周囲の液滴を洗い流す、または拭き取るなどの行為は、材料内部の薬剤をも漏出させてしまう危険性があるため、避けなければならないであろう。そこで、液交換は常に半量とすれば、Eq. 3-1 に示したように、 n 回目の測定値から前回 ($n-1$ 回目)の測定値の半量を減じることで、リーズナブルな結果が得られると考えられる。

$$R_n (\%) = \frac{C_n \times l - (C_{n-1} \times l) / 2}{w \times r / 100} \times 100 \quad (\text{Eq. 3-1})$$

C_n : n 回目の回収日の定量値 (μg/mL)
 l : 試験液量 (= 2 mL)
 w : 試験開始前に測定した試験片重量 (μg)
 r : 薬剤添加率 (wt%)

3.4.3. 結果と考察

3.4.3.1. 薬剤分析方法

Fig. 3-14に、吸光光度法による紫外-可視吸収スペクトルの分析結果を示した。PTXおよびCBDCAは、それぞれ強い紫外吸収スペクトルを示したが、同じ様な波長領域に吸収帯を有するため、2剤内包試料からの溶出を正確に評価することは難しいと考えられた。

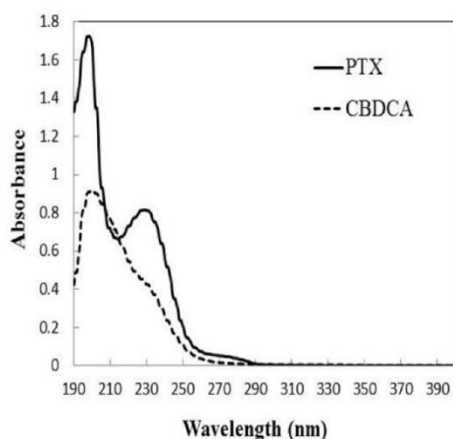


Fig. 3-14 UV-Vis absorption spectrum of PTX and CBDCA

この場合は、HPLC法を用いてそれぞれ分離、濃縮して分析するのが妥当であろう。その結果、溶出時間約6 min、18 minに顕著なピークを検出した (Fig. 3-15)。これらのピークの帰属を検証するために、PTXおよびCBDCAの混合溶液ではなく、それぞれ単独かつ同様のHPLC条件で分析したところ、溶出時間6 minのピークがCBDCA、18 minのピークがPTXであることが示された (Fig. 3-16)。本研究においては、脂溶性の高いPTXの溶出の方が遅く、18 minのピークに帰属されることは容易に察することができるであろう。しかしながら、一般的にHPLCの結果から物質を同定するためには、Fig. 3-16のようなスタンダードとの比較、もしくは分取した溶離液に関して、紫外-可視吸収スペクトル、各種電気泳動、ウエスタンブロッティング、またはLC/MSなどを用いて分析する必要がある。いずれにしてもPTXおよびCBDCAを、HPLC法を用いて同時に分析することが可能であった。以降、本研究における薬剤の定量分析は、このHPLC法を用いて行った。

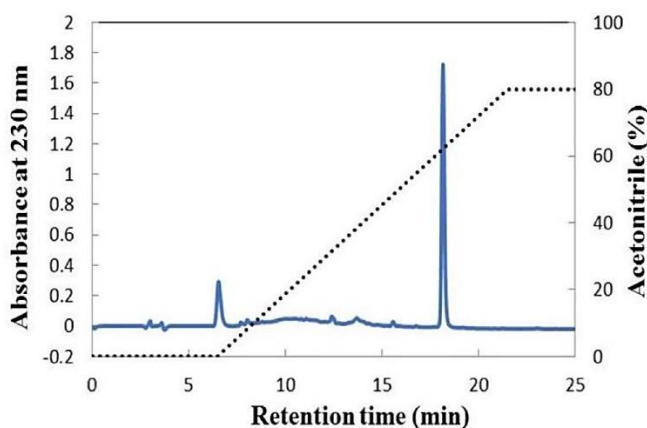


Fig. 3-15 Chromatographic analysis of PTX and CBDCA using HPLC method

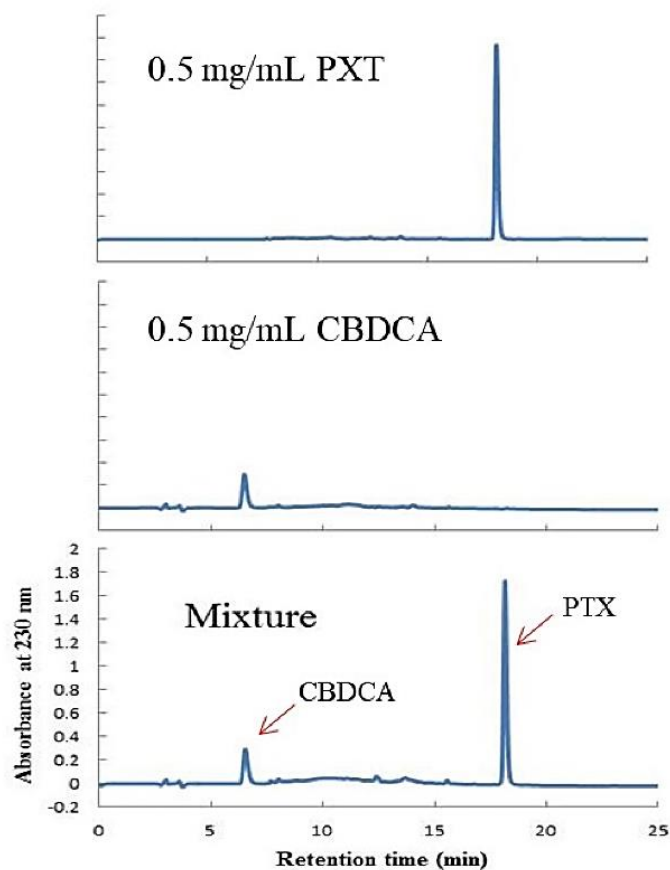


Fig. 3-16 Individual analysis with HPLC for peak attribution

3.4.3.2. In vitro 薬物放出試験

In vitro 薬物放出試験において、2 剤内包することにより示される放出挙動の変化と、相互作用の検証を行った (Figs. 3-17, 3-18)。フィルム No. は、合成条件のセクションで示した Table 3-6 に対応しており、各 $n=3$ の平均値を示した。統計解析として Microsoft Excel 2016 を用いた t 検定を実施し、 $p < 0.05$ を統計的有意とした。

3.4.3.2.1. PTX の測定結果

2 剤内包フィルムからの PTX の溶出は、単剤内包フィルムと比較して、統計的な有意差は見られなかったが、3 日目など増大傾向 ($0.05 < p < 1$)を示す測定ポイントも観察された (Fig. 3-17)。

3.4.3.2.2. CBDCA の測定結果

2 剤内包フィルムからの CBDCA の溶出も、単剤内包フィルムと比較して、統計的な有意差は見られなかった (Fig. 3-18)。

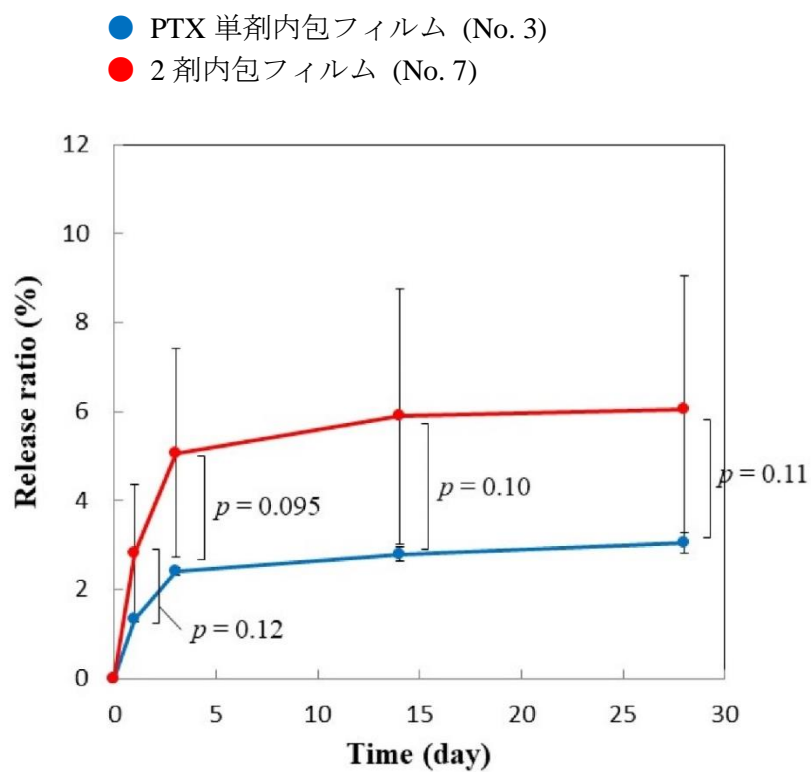


Fig. 3-17 Release profile of PTX from PTX-impregnated and PTX and CBDCA-impregnated PCL film

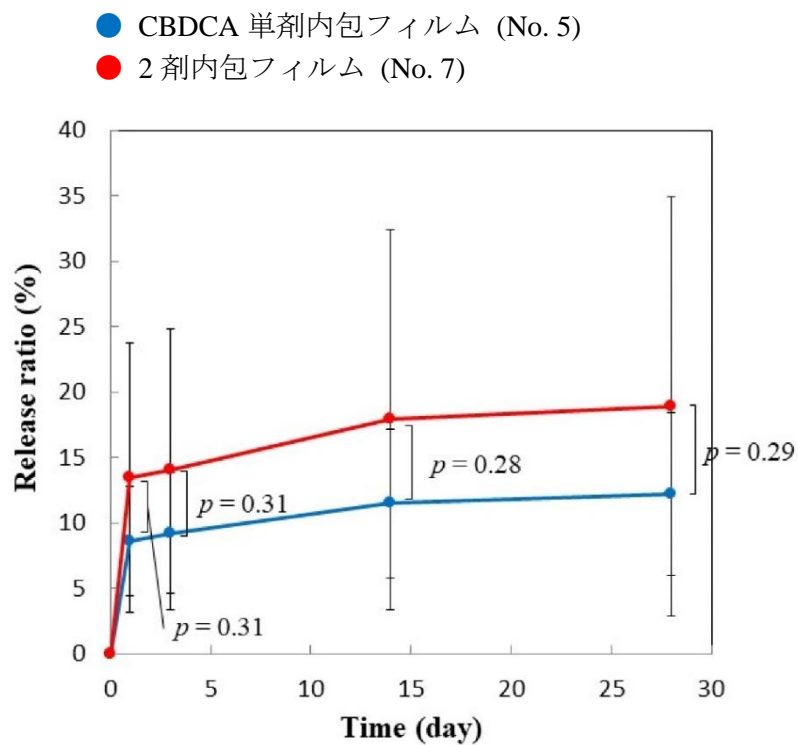


Fig. 3-18 Release profile of CBDCA from CBDCA-impregnated and PTX and CBDCA-impregnated PCL film

3.4.3.3. 信頼区間

一般的に薬剤が内包された部分のポリマーは結晶化しないと考えられるため、本研究においても、2剤内包することでPCLの結晶性が低下し、薬物放出は加速されると仮説を立てていた。Figs. 3-17, 3-18の結果より、 $n=3$ で測定した平均値は、当初の予想通り2剤内包フィルムからの溶出の方が増大していたが、バラツキが大きく、統計的有意差は認められなかった。しかしながら近年、この t 検定による統計解析を自粛もしくは回避しようとする動きが世界規模で広がりつつある⁵¹。これは、 t 検定が平均値1点における比較であることに起因しており、例えば新薬の有効性試験などの解析において、有意差なし=効果なしという誤った解釈がなされる危険性があると指摘されている。そこで文献 No. 51 では、母集団の平均などを幅 (区間)を持たせて推定、つまり、母平均の信頼区間を解析することを推奨している。そこで、本結果の有効性や有意性を詳細に検証するため、2剤内包フィルムにおける、単剤内包フィルムの放出率に対する優越性の、95%信頼区間を、Microsoft Excel 2016 を用いて算出した。

結果を Fig. 3-19A および Fig. 3-19B に示した。これらは母平均の差の信頼区間を示しており、両薬剤の放出率の差が、95%の確率でこの区間に入ることを意味している。数値“0”は両者に差が無いことを意味し、プラスの数値は2剤内包フィルムの薬物放出率が大きいこと、マイナスの数値は単剤内包フィルムの薬物放出率が大きいことを示している。一般的には、すべての測定ポイントにおいて、区間が“0”をまたいでいるため、今回の系では、両者の間に統計的な有意差は認められないという解釈になる。しかしながら、プラス側の区間に入る確率も大きいことから、やはり薬剤の添加と結晶性の低下は、薬物放出と相関するポテンシャルを有するのではないかと考えられ、 n 数を増やすなどして更なる追加検証は必要であると考えられた。

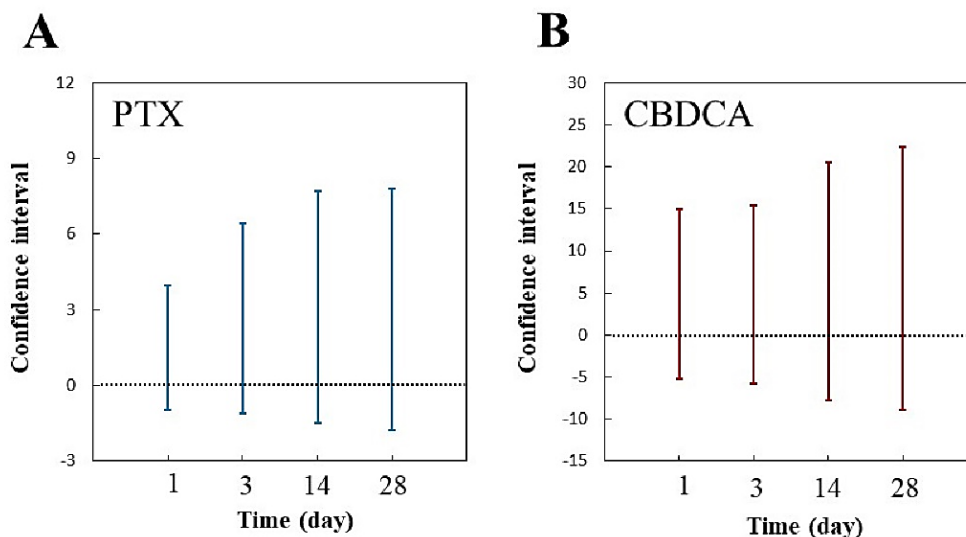


Fig. 3-19 Confidence intervals of two-drug-impregnated films' superiority in the release ratio of (A) PTX and (B) CBDCA.

3.4.3.4. 結晶化度

結晶化度は、各フィルムの DSC 分析の結果から、その融点におけるエンタルピー変化 (ΔH_m)を、100%結晶化 PCL の文献値に対する比として、以下の関係式 Eq. 3-2 により算出した¹⁴。

$$\text{Crystallinity (\%)} = \Delta H_m / 142 \times 100 \quad (\text{Eq. 3-2})$$

その結果、薬剤を内包しないフィルム (No. 1)と比較して、薬剤内包フィルム (No. 3, 5)の方が結晶性が低下しており、また単剤よりも2剤内包フィルム (No. 7)の方がより低下していることが示された (Fig. 3-20)。また、それぞれに対応する薬物放出の、Fig. 3-17 および Fig. 3-18 の結果を重ねてみると、2剤内包により PCL の結晶性が低下し、それに伴い薬物放出は加速するポテンシャルを、やはり有していると考えられた。今回は2剤内包の系ということで、ポリマー内での各薬剤の分散性や溶出速度の違いなどに起因する相互作用も起こり得たと考えられ、それらがデータバラツキの要因になった可能性も考えられた。

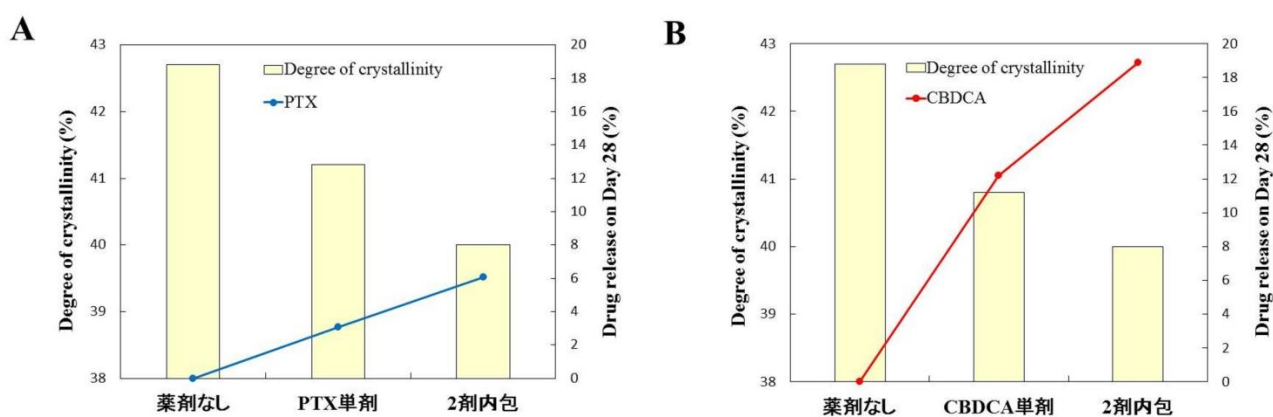


Fig. 3-20 Correlation between crystallinity and drug release in films containing (A) PTX and (B) CBDCA

3.5. 相互作用検証

3.5.1. 薬剤－薬剤間相互作用

PTX および CBDCA の混合における薬剤間相互作用に関して検証した。検証方法は、塩野義製薬が公開している、配合変化表の試験方法に準じて行った⁵²。DMF を用いて調製した 0.5 mg/mL PTX と 0.5 mg/mL CBDCA を当量 (1:1)混合し、フィルム合成時と同じ 80℃、3 hr 反応させ、反応後溶液の外観変化、および反応前後の HPLC (セクション 3.4.1.2.と同様に実施)のピーク面積比を残留力価と定義して検証した。その結果、PTX、CBDCA 共に、反応後の外観に変化はなく、残留力価はそれぞれ、93.1±0.554%、98.0±1.99%であった。したがって、PTX および CBDCA の混合における薬剤間相互作用は、本研究においては極めて低いと考えられた。

3.5.2. 薬剤－材料間相互作用

PTX および CBDCA と PCL との薬剤－材料間相互作用に関して検証した。検証方法は、Fig. 3-21 に示したように、シンプルな反応系を構築して行った。セクション 3.2.1.3. で作製した PCL-m 5 mg に、DMF 100 μ L、DMF で調製した 1 mg/mL PTX もしくは CBDCA 50 μ L を添加して混合し、フィルム合成と同じ 80°C、3 hr 反応させ、反応上清中の薬剤量をセクション 3.4.1.2. で示した HPLC 法により測定した。その結果、PTX、CBDCA 共に、上清中の薬剤量は PCL の有無に関わらず、反応前後でほとんど変化がなかった (Fig. 3-22)。したがって、PTX および CBDCA と PCL との薬剤－材料間相互作用は、極めて低いもしくは無視できると考えられた。

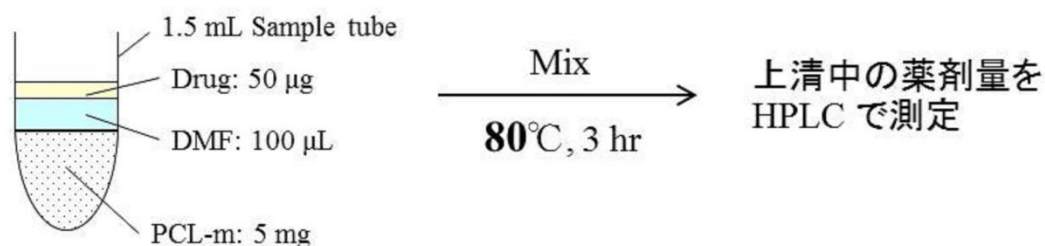


Fig. 3-21 Schematic illustration of the experimental system for evaluating drug-PCL interaction.

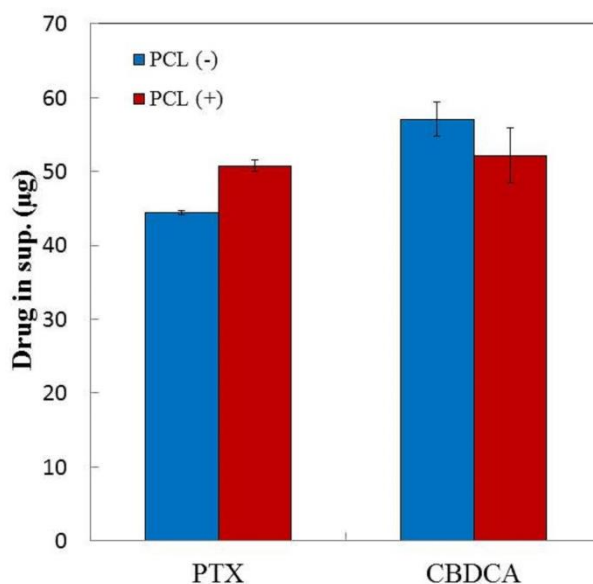


Fig. 3-22 Drug amount in the supernatant with and without PCL.

3.6. 第3章のまとめ

以上、第3章で得られた知見を以下にまとめた。

Table 3-7 Summary of Chapter 3

	第2章	第3章	第4章
	無機材料	有機材料	無機－有機複合体
基材	リン酸カルシウム骨ペースト	ポリカプロラクトン (PCL)	磁性ナノ粒子－PCL複合体
薬剤	バンコマイシン ゲンタマイシン	パクリタキセル カルボプラチン	パクリタキセル カルボプラチン

- ・ PCL は、分岐、架橋、鎖長のアレンジで結晶性を制御でき、薬物放出基材として適していた。
- ・ PTX および CBDCA を内包し、融点を 40℃ 付近に有する PCL フィルムを合成した。
- ・ 薬剤の内包によって PCL の結晶性が低下した。
- ・ 単剤内包と 2 剤内包で、薬物放出に大きな差はなかった。
- ・ PTX および CBDCA の薬剤間相互作用、また PCL との薬剤－材料間相互作用は低かった。

3.7. 参考文献

- 1 Ikeda, S.; Uchiyama, K.; Minegishi, Y.; Ohno, K.; Nakamura, M.; Yoshida, K.; Fukushima, K.; Takahira, N.; Takaso, M., Double-layered antibiotic-loaded cement spacer as a novel alternative for managing periprosthetic joint infection: an in vitro study. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* **2018**, *13*, doi.org/10.1186/s13018-018-1033-5.
- 2 本間精一，射出成形特性を活かすプラスチック製品設計法. **2011**，日刊工業新聞社
- 3 日本バイオプラスチック協会パンフレット，10.12-40.
- 4 勝呂徹，Revision TKA の基本手技 人工膝関節再置換術－確かな機能の再建をめざして－**2009**，メジカルレビュー社.
- 5 Gangadhar, N. B., Formulation and evaluation of controlled release tablets of antiepileptic drugs. *Asian Journal of Pharmacy and Technology* **2014**, *4*, 117-130.
- 6 吉田亮; 岡野光夫; 酒井清孝; 桜井靖久，ドラッグデリバリーシステム. *BME* **1990**, *4*, 23-33.
- 7 Smart Biomaterials, *NIMS Monographs*, Springer.

- 8 Uto, K.; Yamamoto, K.; Hirase, S.; Aoyagi, T., Temperature-responsive cross-linked poly(ϵ -caprolactone) membrane that functions near body temperature. *Journal of Controlled Release* **2006**, *110*, 408-413.
- 9 Kim, Y. J.; Ebara, M.; Aoyagi, T., A smart hyperthermia nanofiber with switchable drug release for inducing cancer apoptosis. *Advanced Functional Materials* **2013**, *23*, 5753-5761.
- 10 Niiyama, E.; Uto, K.; Lee, C. M.; Sakura, K.; Ebara, M., Alternating magnetic field-triggered switchable nanofiber mesh for cancer thermo-chemotherapy. *Polymers* **2018**, *10*, Article ID 1018.
- 11 Hoffman, R. K.; Warshowsky, B., Beta-propiolactone vapor as a disinfectant. *Applied and Environmental Microbiology* **1958**, *6*, 358-362.
- 12 大津隆行, 改訂 高分子合成の化学 **1979**, 化学同人.
- 13 橘高敦史, 創薬科学・医薬化学 **2007**, 化学同人.
- 14 Ebara, M.; Uto, K.; Idota, N.; Hoffman, J. M.; Aoyagi, T., Shape-memory surface with dynamically tunable nano-geometry activated by body heat. *Advanced Materials* **2012**, *24*, 273-278.
- 15 Santos, R. N.; Andricopulo, A. D., Physics and its interfaces with medicinal chemistry and drug design. *Brazilian Journal of Physics* **2013**, *43*, doi 10.1007/s13538-013-0149-7
- 16 Mukaiyama, T.; Shiina, I.; Iwadare, H.; Saitoh, M.; Nishimura, T.; Ohkawa, N.; Sakoh, H.; Nishimura, K.; Tani, Y.; Hasagawa, M.; Yamada, K.; Saitoh, K., Asymmetric total synthesis of Taxol[®]. *Chemistry a European Journal* **1999**, *5*, 121-161.
- 17 福井次矢, 今日から実践! くすりの基本と処方の Do-Don't **2010**, メジカルビュー社
- 18 Zhang, W.; Zhang, Z.; Tung, C. H., Beyond chemotherapeutics: cisplatin as a temporary buckle to fabricate drug-loaded nanogels. *Chemical Communications* **2017**, *53*, 779-782.
- 19 今村知世, がん薬物療法における臨床薬効評価学 (PK/PD). *Japanese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **2016**, *47*, 62-67.
- 20 ブリストル・マイヤーズ スクイブ株式会社, タキソール[®]注射液添付文書.
- 21 ブリストル・マイヤーズ スクイブ株式会社, パラプラチン[®]注射液添付文書.
- 22 国立がん研究センター がん対策情報センター, 最新がん統計 **2016**.
- 23 Gurung, A.; Hung, T.; Morin, J.; Gilks, C. B., Molecular abnormalities in ovarian carcinoma: clinical, morphological and therapeutic correlates. *Histopathology* **2013**, *62*, 59-70.

- 24 Enomoto, T.; Kuragaki, C.; Yamasaki, M.; Sugita, N.; Ohtsuki, Y.; Ikegami, H.; Matsuzaki, N.; Yamada, T.; Wakimoto, A.; Murata, Y., Is clear cell carcinoma and mucinous carcinoma of the ovary sensitive to combination chemotherapy with paclitaxel and carboplatin? **2003** Annual Meeting American Society of Clinical Oncology.
- 25 Malpica A.; Deavers M. T.; Lu, K.; Bodurka, D. C.; Atkinson E. N. Gershhenson, D. M.; Silva, E. G., Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *The American Journal of Surgical Pathology* **2004**, 28, 496-504.
- 26 平岡伸介, がんの悪性度. ドクターサロン **2018**, 62, 18-21.
- 27 川田志明, 心臓腫瘍の少ない理由. 耳寄りな心臓の話第61話, 日本心臓財団刊行物.
- 28 Therasse, P.; Arbuck, S.; Eisenhauer, E. A.; Wanders, J.; Kaplan, R. S.; Rubinstein, L.; Verweij, J.; Van Glabbeke, M.; van Oosterom, A. T.; Christian, M. C.; Gwyther, S. G., New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *Journal of the National Cancer Institute* **2000**, 92, 205-216.
- 29 Katsumata, N.; Yasuda, M.; Takahashi, F.; Isonishi, S.; Jobo, T.; Aoki, D.; Tsuda, H.; Sugiyama, T.; Kodama, S.; Kimura, E.; Ochiai, K.; Noda, K., Dose-dense paclitaxel once a week in combination with carboplatin every 3 weeks for advanced ovarian cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* **2009**, 374, 1331-1338.
- 30 Gompertz, B., On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1825**, 115, 513-585.
- 31 Norton, L.; Simon, R., Tumor size, sensitivity to therapy, and design of treatment schedule. *Cancer Treatment Reports* **1977**, 61, 1307-1317.
- 32 Norton, L., A Gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer Research* **1988**, 48, 7067-7071.
- 33 Uto, K.; Ebara, M.; Aoyagi, T., Temperature-responsive poly(ϵ -caprolactone) cell culture platform with dynamically tunable nano-roughness and elasticity for control of myoblast morphology. *International Journal of Molecular Sciences* **2014**, 15, 1511-1524.
- 34 Uto, K.; Ebara, M., Magnetic-responsive microparticles that switch shape at 37°C. *Applied Sciences* **2017**, 7, Article ID 1203.
- 35 Zhou, J.; Wang, W.; Villarroya, S.; Thurecht, K. J.; Howdle, S. M., Epoxy functionalised poly(ϵ -caprolactone): synthesis and application. *Chemical Communications* **2008**, 5806-5808.

- 36 Noda, M.; Okuyama, H., Thermal catalytic depolymerization of poly(L-lactic acid) oligomer into LL-lactide: Effects of Al, Ti, Zn, and Zr compounds as catalysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1999**, 47, 467-471.
- 37 Garlotta, D., A literature review of poly(lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment* **2001**, 9, 63-84.
- 38 Kowalski, A.; Duda, A.; Penczek, S., Kinetics and mechanism of cyclic esters polymerization initiated with Tin(II) octoate. 3. Polymerization of 1,l-dilactide. *Macromolecules* **2000**, 33, 7359-7370.
- 39 Schotten, C., Ueber die oxydation des piperidins. *Juli-Dezember* **1884**, 17, 2544-2547.
- 40 Baumann, E., Ueber eine einfache methode der darstellung von benzoesaureathern. *Juli-Dezember* **1886**, 19, 3218-3222.
- 41 Tswett, M. S., On a new category of adsorption phenomena and their application to biochemical analysis. *Lecture at the March* **1903**, 8, 21.
- 42 池上亨; 田窪宏貴; 田中信男, 親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC) –開発の背景, および分離モードの特徴. *Chromatography* **2008**, 29, 1-6.
- 43 Kirkland, J. J., High-speed liquid chromatography with controlled surface porosity supports. *Journal of Chromatographic Science* **1969**, 7, 7-12.
- 44 社団法人日本食品衛生協会, 食品衛生検査指針食品添加物編. **2003**.
- 45 Kato, R.; Sato, T.; Kanamori, M.; Miyake, M.; Fujimoto, A.; Ogawa, K.; Kobata, D.; Fujikawa, T.; Wada, Y.; Mitsuishi, R.; Takahashi, K.; Imano, H.; Ijiri, Y.; Mino, Y.; Chikuma, M.; Tanaka, K.; Hayashi, T., A novel analytical method of cisplatin using the HPLC with a naphthylethyl group bonded with silica gel (π NAP) column. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2017**, 40, 290-296.
- 46 北見秀明; 石原良美; 高野二郎, トリアコンチル基結合型シリカ固定相を用いる逆相液体クロマトグラフィーによる大豆油中のトコフェロール類4種の定量. *BUNSEKI KAGAKU* **2011**, 60, 593-597.
- 47 須藤良久, 理想の HPLC 用 ODS カラムを求めて. *The Chemical Times* **2008**, 1, 3-10.
- 48 酒井芳博, 液体クロマトグラフィーの基礎技術(1) –逆相クロマトグラフィーとカラムの選び方 その1–. *The Chemical Times* **2007**, 3, 13-17.
- 49 長江徳和, 水 100%移動相を用いた高速液体クロマトグラフィー逆相固定相の保持挙動. *BUNSEKI KAGAKU* **2010**, 59, 193-205.

- 50 HPLC の上手な使い方 I 章ー3 化学結合型シリカゲルの特性. ジーエルサイエンス株式会社
web サイト, https://www.gls.co.jp/technique/technique_data/lc/usage_of_hplc/P1_3.html
- 51 Amrhein, V.; Greenland, S.; McShane, B., Retire statistical significance. *Nature* **2019**, 567,
305-307.
- 52 塩野義製薬, 塩酸バンコマイシン点滴静注用 0.5 g 配合変化表.

第 4 章

無機－有機複合材料を用いた薬物放出

4.1. 諸言

本章では、無機-有機複合材料を用いた薬物放出として、磁性ナノ粒子 (MNPs)-ポリカプロラクトン (PCL)の複合材料を取り上げ、その薬物放出や相互作用を検証する。

4.1.1. MNPs-PCL 複合化の意義

温熱療法の問題点の一つとして、身体全体が加温されることによる発汗や脱水症状、それに伴う倦怠感などが指摘されているが、井藤らは、温熱療法に DDS の概念を取り入れた¹。つまり、セクション 1.4.4.で述べたような医療用リポソーム内に MNPs を封入し、腫瘍組織に到達させた後に外部から磁場を与え、これにより、がん細胞のみを直接加温することができるという手法である。しかしながら、一般的に温熱療法は、高濃度ビタミン C 点滴療法や免疫療法などと並び補助療法という位置付けにあり、他の治療法が不可能な場合を除き、単独ではなく三大標準治療法(外科手術、化学療法、放射線療法)などと共に、いくつか併用して実施されることが多い²。

それではそのリポソーム内に、MNPs だけでなく抗がん剤も封入すれば良いかというと、そう単純ではなく、化学療法と温熱療法を併用するには効かせ方やタイミングが極めて重要となる。基本的にはそれらを同時に作用させることで抗腫瘍効果が増大することが知られており³、この理由として、温熱療法の加温によりがん細胞の細胞膜が変性して、抗がん剤を取り込みやすくなるためと考えられている⁴。従来のリポソーム製剤からの薬物放出は、膜の透過性を利用した自然拡散やマクロファージの貪食による小胞の崩壊が律速となるものが多く⁵、それゆえ磁場の印加による発熱と同じタイミングで能動的に薬物放出を制御することは、これまでは非常に難しかったと言える。

そこでキーマテリアルとなるのが、スマートポリマーである。近年、温度応答性ポリマーとして知られる、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を応用したリポソームや高分子ミセル型の DDS キャリアが報告され、温度変化をトリガーとした薬物放出制御の方法論が示された⁶。一方で Fig. 4-1 は、リポソームや高分子ミセル型 DDS 製剤の作用機序を示しているが、ここに輸送型 DDS の限界があると言われる⁷。輸送型 DDS において重要な役割を担うのが Enhanced Permeability and Retention (EPR)効果である⁸。EPR 効果とは、腫瘍周辺における血管透過性の亢進のため、高分子薬剤が血管壁を抜けて高い腫瘍内蓄積性を示すという特性を意味し、基本的に抗がん剤の研究はこの EPR 効果が基盤となっている。しかしながら、その腫瘍集積性は高々10%程度であり、残りの90%は標的部位以外に拡散または代謝され、副作用や長期毒性の原因になる場合があると報告されている⁷。

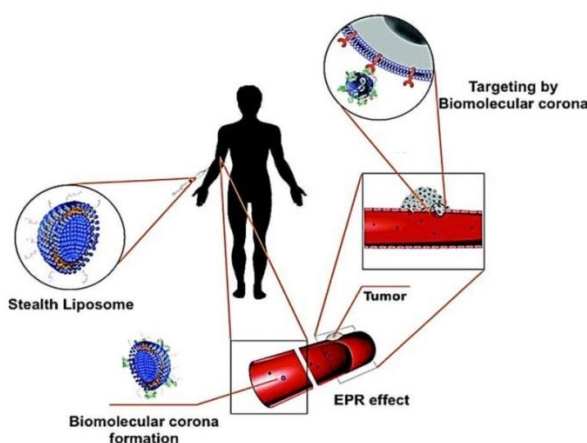


Fig. 4-1 Schematic illustration of functional mechanism of liposomal formulation⁹

一方で、移植型 DDS 製剤は、薬剤を局所に高濃度作用させることが可能である反面、一度移植してしまうと **uncontrollable** であることがデメリットとして認識されてきた。しかしながら近年、化学療法と温熱療法を同時に実現できる、スマートポリマーを用いた **controlable** な移植型 DDS 製剤が報告されている^{3,10,11}。簡潔に言うと、温度応答性のスマートポリマーにあらかじめ薬剤と MNPs を内包しておき、外部交流磁場の印可により発熱した MNPs がポリマーをアモルファス化することで、薬剤が効果的に放出される。Fig. 4-2 に本ストラテジーの模式図を示す。このような **One-pot** タイプであることには非常に意義がある。例えば、熱源である MNPs を内包せず、従来の温熱療法を薬物放出制御のトリガーとして利用した場合、パフォーマンスステータス 3 以上の進行がん患者では、上述したように、このサウナ風呂のような温熱環境には耐えることができない⁴。また日本ハイパーサーミア学会によると、実際の温熱療法では、がん細胞を理論通りの 42.5℃以上に加温することは一般的に難しく、40-42℃のマイルドハイパーサーミアと呼ばれる状態にあると言われている。そのため、スマートポリマーの温度応答性を制御するには、その効率もあまり良くないと見られる。したがって、本法のモデルのように **One-pot** タイプとすることで、MNPs の熱エネルギーをがん細胞に直接作用させられるだけでなく、スマートポリマーの結晶-非晶相転移にも効率よく働き、ストラテジー通りの抗腫瘍効果が得られると考えられる。

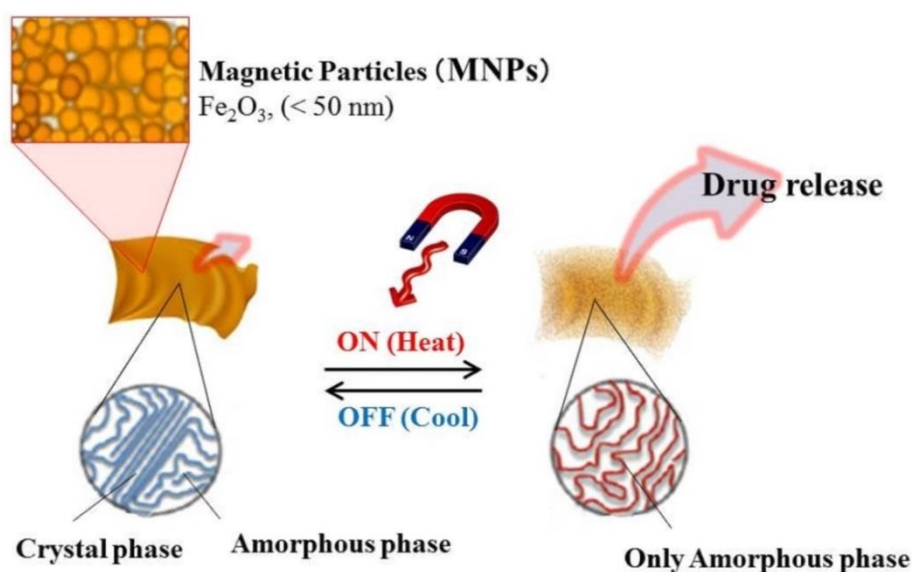


Fig. 4-2 Schematic illustration of drug release strategy using smart materials

4.1.2. MNPs

MNPs とは常磁性を有するナノサイズの粒子を意味し、酸化鉄およびその類縁物質を指す場合が多い。酸化鉄ナノ粒子は生体安全性が高く、上述したような温熱療法や、核磁気共鳴画像法 (MRI) のコントラスト造影剤としても実用化されている。多くの結晶型が知られているが、本研究で用いるのは γ 相の酸化鉄(III) (γ - Fe_2O_3)、粒径 < 50 nm のナノパウダーで、特にフェリ磁性を示す。フェリ磁性とは、スピン (磁気モーメント) の向きが正反対の磁性イオンを有しながら、そ

れらが等価ではないために打ち消し合うことがなく、全体として強い磁性を示すもので、医療機材として応用されている。 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ の他に医療用として汎用されているものに、四酸化三鉄 (Fe_3O_4)がある。これらの磁性体が医療用途に適している理由は、合成方法が比較的容易であることや、物理的、化学的に安定であること、原料が安価であることなどが挙げられる。さらにこれらの磁性体は、10 nm 以下のナノ粒子になると、超常磁性という性質を帯びるようになる。超常磁性とは、磁場を取り除くと磁化がほぼゼロになる性質であり、これにより血管内でも凝集や閉塞することなく、速やかに分散することができる¹²。

一方で、酸化鉄粒子の表層は容易に水和し、表面水酸基を生成している (Fig. 4-3)¹³。例えば、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ は等電点が 5.5 であるため、生理的環境においては負電荷を有することから、吸着や置換など様々な特徴的な表面化学反応を示す。これは金属酸化物に広く見られる性質で、土壌中の有害元素や重金属イオンの吸着や浄化にも役立っている¹⁴。

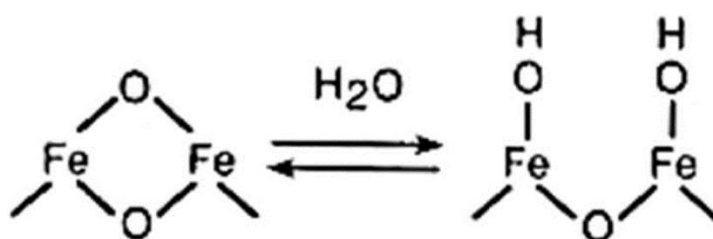


Fig. 4-3 Hydration of iron oxide surface¹³

4.2. 実験

4.2.1. 試薬

本章で使用した試薬および装置のリストを下記に示す。

Table 4-1 Reagent list used in this section

Reagent	Abbreviation	Company	Location
1,4-Butandiol	—	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
ϵ -Caprolactone	CL	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Tin (II) 2-ethylhexanoate	—	Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
Tetrahydrofuran	THF	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Diethylether	—	Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
Hexane	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Triethylamine	TEA	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Acryloyl chloride	—	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd	Tokyo, Japan

Sodium chloride	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Potassium chloride	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Disodium hydrogenphosphate 12-water	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Potassium dihydrogen phosphate	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Methanol	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Paclitaxel	PTX	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Carboplatin	CBDCA	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd	Tokyo, Japan
Acetonitrile for HPLC	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Benzoyl peroxide	BPO	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
N,N-dimethylformamide	DMF	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Iron (III) oxide nanopowder (< 50 nm)	MNPs	Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
Dichloromethane	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Toluen	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
<i>p</i> -Xylene	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Potassium bromide	KBr	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Sodium perchlorate	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Perchloric acid	—	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan

Table 4-2 Experimental device list used in this section

Device	Model	Company	Location
Spectrophotometer	UV-1800	Shimadzu Corporation	Kyoto, Japan
High-performance liquid chromatography (HPLC) column	CAPCELL PAK C18 UG120	Osaka Soda Co., Ltd.	Osaka, Japan
HPLC device	Elite LaChrom	Hitachi High-Technologies Corporation	Tokyo, Japan

Thermo gravimeter (TG)	TG/DTA 6200	Seiko Instruments Inc.	Chiba, Japan
IR-thermo camera	CPA-E6	FLIR Systems Japan K.K.	Tokyo Japan
Differential scanning calorimetry (DSC)	Thermo plus EVO2 DSC8231	Rigaku Corporation	Tokyo, Japan
Contact angle meter	Drop Master 500	Kyowa Interface Science Co., Ltd.	Saitama, Japan
Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)	Frontier FT IR	PerkinElmer Japan Co., Ltd.	Kanagawa, Japan

4.2.2. MNPs－PCL 複合化フィルムの作製

MNPs を添加した以外は、セクション 3.2.と同様に、Table 4-3 の割合で作製した。

Table 4-3 Composition list of PCL film

No.	PCL-m (mg)	BPO (mg)	PTX (mg)	CBDCA (mg)	MNPs (mg)	DMF (μL)
1	588.0	12	—	—	—	625.5
2	392.0	7.8	—	—	200	417.0
3	576.2	12	12	—	—	613.0
4	380.2	7.6	12	—	200	404.5
5	576.2	12	—	12	—	613.0
6	380.2	7.6	—	12	200	404.5
7	564.5	12	12	12	—	600.5
8	368.5	7.4	12	12	200	392.0

4.2.3. 熱分析

4.2.3.1. 実験

MNPs が正確かつ効率よく内包されているか検証を行った。薬剤を内包しないフィルム (No. 2) の条件において、MNPs 添加量を 150 mg (138.6 mg, 23.1wt%)、200 mg (200 mg, 33.3wt%)、250 mg (247.2 mg, 41.2wt%)に変更してそれぞれ PCL フィルムを合成し (括弧内は実際に秤量して仕込んだ MNPs 量と、その際の溶質に対する添加率を示す)、10°C/min、25－500°Cの条件で熱重量分析 (TG)を行った。MNPs を添加しない PCL フィルム (No. 1)、および MNPs のみをコントロールとして用い、それぞれ 0.00wt%群、100wt%群とした。試験開始前の試料重量を 100%とし、500°Cに昇温後の残留試料の重量%を MNPs 添加率と定義した。

4.2.3.2. 結果と考察

Fig. 4-4 に熱分析のプロフィール、および Table 4-4 に本検証により実測された MNPs の添加率と仕込み量との相関を示した。その結果、実測値と仕込み量がほぼ等しく、MNPs は効率よく PCL フィルムに内包させることが可能で、かつ添加率は仕込みの段階で制御可能であることが示された。

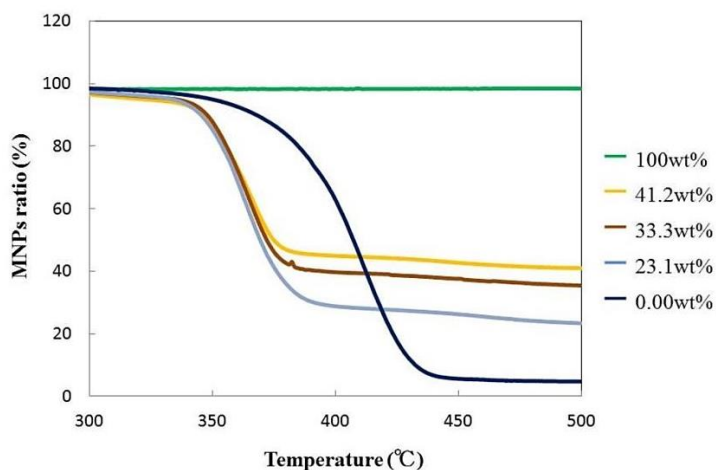


Fig. 4-4 Thermogravimetric analysis of PCL films with different MNPs loadings

Table 4-4 Correlation between preparation amount and measured value in MNPs addition rate

Preparation amount	23.1wt%、	33.3wt%	41.2wt%
Measured value	19.5wt%、	31.6wt%	46.8wt%

4.2.4. 発熱挙動

4.2.4.1. 実験

セクション 4.1.1. で述べたように、本 PCL フィルムを用いた薬物放出は、外部交流磁場の印加による MNPs の発熱がトリガーとなる。そのため、PCL フィルムに実際に交流磁場を印加した際の発熱挙動を検証した。MNPs 添加率を 0wt%、19.5wt%、31.6wt%、46.1wt% で変化させて合成した PCL フィルムを 2.0 cm² にカットし、銅製コイル内に設置した。誘導加熱電源装置から交流磁場 (1.1 kA/m, 281 kHz, 4.0 V) を 6 min 照射し、発熱挙動は IR-サーモカメラで得られた画像から評価した。なお、上記の MNPs 添加率は、セクション 4.2.3. と同様に TG 分析で実測された値である。

4.2.4.2. 結果と考察

Fig. 4-5 に、MNPs 添加率 0wt% および 31.6wt% で合成された PCL フィルムの、IR-サーモカメラ画像を示した。これによると、交流磁場印加前の PCL フィルムは 20-22°C 程度を示しているが、交流磁場印加後、MNPs を内包しない PCL フィルムの温度はほとんど変化しないのに対し、MNPs

を内包した PCL フィルムの温度は速やかに上昇した。また Fig. 4-6 は、各フィルムの発熱挙動の経時変化を示しているが、発熱温度は、内包した MNPs の量依存的に増加した。したがって本 MNPs-PCL 複合フィルムは、外部交流磁場の印加により発熱し、PCL フィルムの相転移を誘導できるポテンシャルを有することが確認された。

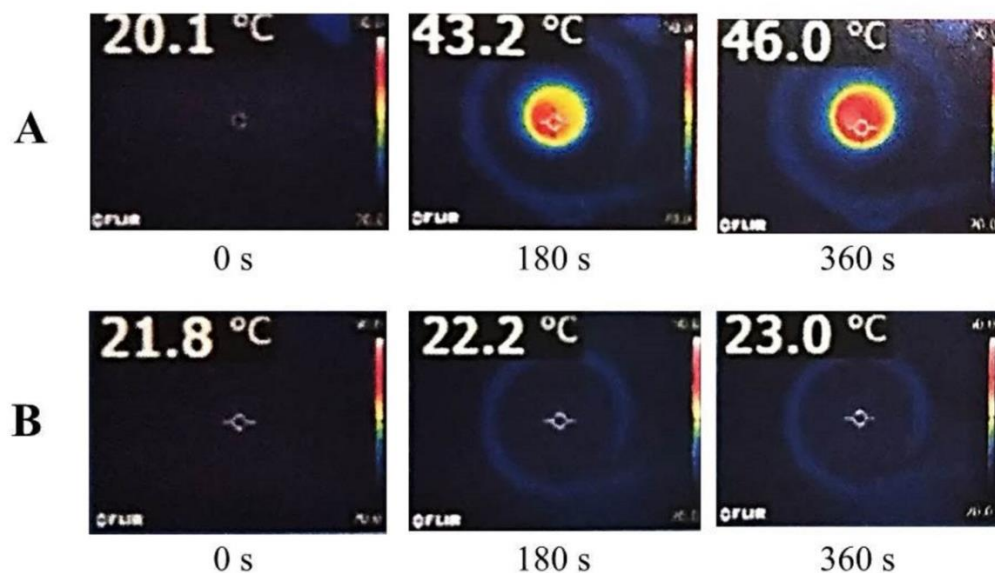


Fig. 4-5 The infrared thermal images of the PCL film with (A) 31.6wt% and (B) 0wt% MNPs loading, in a copper coil

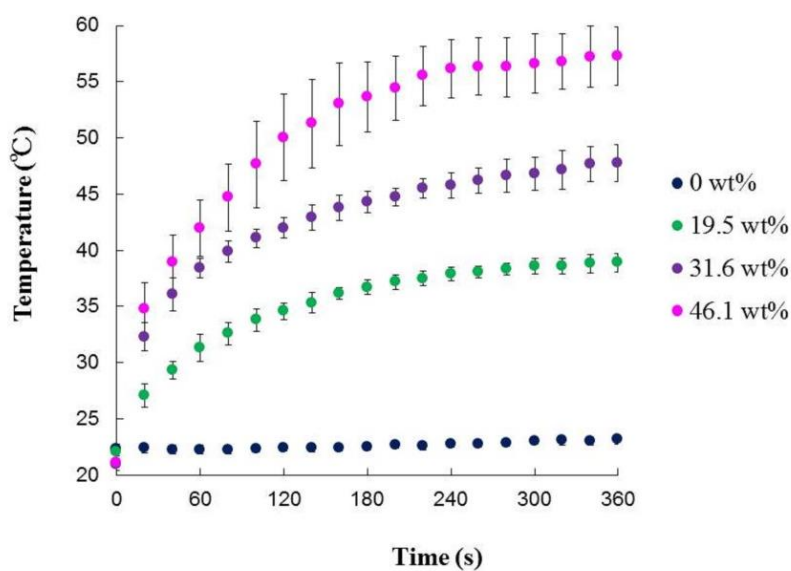


Fig. 4-6 The heating profile of PCL-film with different MNPs loading

4.2.5. 融点検証

4.2.5.1. 実験

本 MNPs-PCL 複合化フィルムの薬物放出を制御するキーファクターは、結晶性および融点の低下である。最終的に得られた MNPs-PCL 複合化フィルムの融点を、DSC を用いて検証した。装置の試料室内を約 0℃まで冷却し、昇温速度 5℃/min、目標温度 100℃で測定を開始した。フィルム作製前の PCL や PCL-m をコントロールとして用いた。

4.2.5.2. 結果と考察

Fig. 4-7 に、DSC 分析の結果を示した。これによると、MNPs 内包の有無にかかわらず、PCL フィルムの吸熱ピーク、つまり融点は、生体内温度に近い 40℃付近に調整されていることが示された。また、MNPs-PCL 複合化フィルムの方が、MNPs を内包していない PCL フィルムと比較して、わずかに融点が高温側にシフトしている様子が観察された。そこで、セクション 4.2.3.と同様に実施した TG 分析により、MNPs 添加率既知の種々の PCL フィルムを作製し、DSC 分析を行った結果を Fig. 4-8A に示した。また、各融点におけるエンタルピー変化 (ΔH_m)を算出し、セクション 3.4.3.4.と同様に結晶化度を測定し、比較した結果を Fig. 4-8B に示した。

これによると、MNPs の添加率に応じて融点および結晶化度が上昇していることが示された。この理由として、PCL フィルムに MNPs を内包させた場合、それらが物理的障害物となり PCL 同士の分子間距離が増加することから架橋形成が不利な状態になるため、結果として結晶性および融点の上昇を示したと考えられる。また、フィルム重合前の PCL や PCL-m の融点は高いままであったことから、部分的な架橋点を導入したことにより結晶性および融点を低下させることに成功したと考えられる。

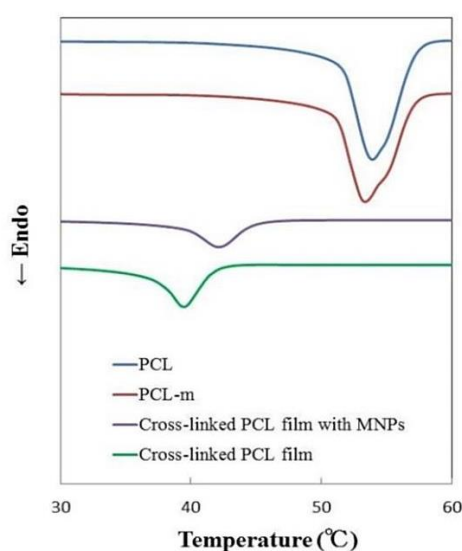


Fig. 4-7 DSC analyses of various PCL materials

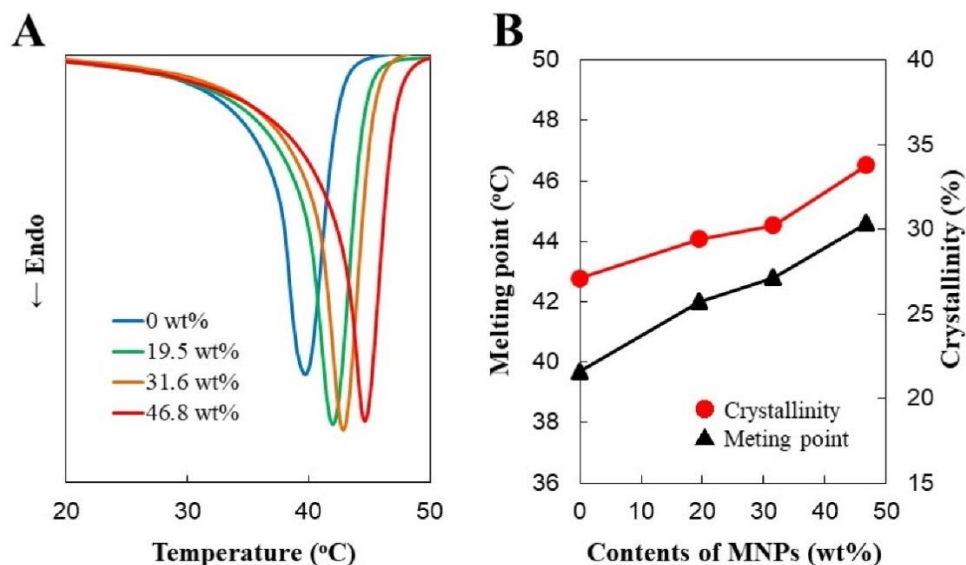


Fig. 4-8 (A) DSC analysis of PCL films with different MNPs loading and (B) their melting points and crystallinity

4.2.6. In vitro 薬物放出試験

37°Cおよび 45°Cに静置した以外は、セクション 3.4.2.と同様に行った。一般的にハイパーサーミアは一定のインターバルで行われるが、本研究では簡単のために、45°C群は実験期間中終始 45°Cに静置された。薬剤分析方法は、セクション 3.4.1.2.と同様に HPLC 法で行った。フィルム No. は、合成条件のセクションで示した Table 4-3 に対応しており、各 n=3 の平均値を示した。

4.2.6.1. パクリタキセル (PTX)の測定結果

MNPs も温熱刺激も加えないフィルムと比較して、MNPs 添加フィルムからの放出は、わずかに減少した。これは相互作用というよりは、セクション 4.2.5..で述べた通り、MNPs の添加によって PCL フィルムの結晶性が上がり、薬物放出にとってバリアとして作用するためであると考えられる。また、温熱刺激を加えたフィルムからの放出は、顕著に減少した。温熱刺激下で PTX の放出は増大すると予想していたため、本事象の要因となっている相互作用に関して、次セクションで詳細に検証する。

- PTX のみ (No. 3, 37°C)
- PTX + MNPs (No. 4, 37°C)
- PTX + 温熱刺激 (No. 3, 45°C)
- PTX + MNPs + 温熱刺激 (No. 4, 45°C)

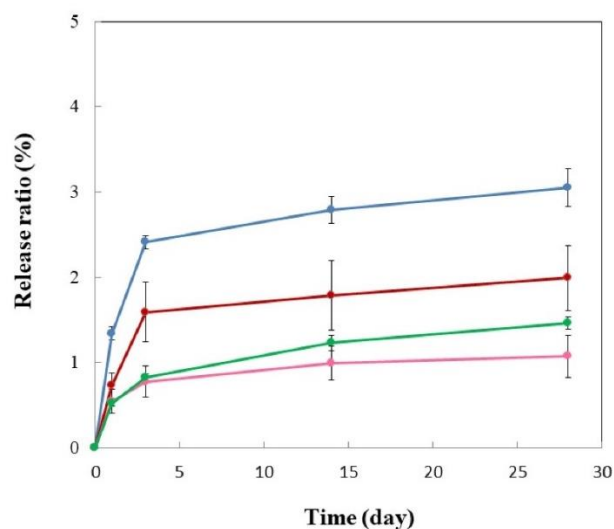


Fig. 4-9 Release profile of PTX with or without MNPs loading at 37°C or 45°C

4.2.6.2. 温熱刺激により PTX の溶出が減少する事象について

PTX は水に対する溶解度が 0.2 μg 程度と極めて脂溶性である¹⁵。そのため、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)中に溶出するよりも PCL の中に潜んでいた方が安定であると考えられる。しかしながら、その性質が温熱刺激により変化する、言い換えれば温度依存性と関連付けるのは、なかなか容易なことではない。その理由として、今回検証および調査された PTX および PCL の熱的性質が、本事象とは真逆の結果、つまり温熱刺激による PTX の溶出促進を示唆するものが多いためである。以下に、その内容を示す。

4.2.6.2.1. PCL の透過性

文献 No. 16 では、Fig. 4-10 に示したような 2 層式の拡散容器を用いて、仕切りであるスマートメンブレンが外部温度刺激に応答してアモルファス化することで、薬剤 (この場合プレドニゾロン) の透過性を増大させることを実証した¹⁶。したがって、本研究における温熱刺激も PCL フィルムの透過性を増大させ、それに伴い PTX の放出は増大するはずであると予想されていた。

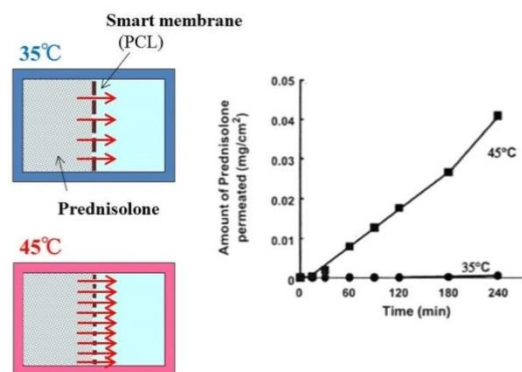


Fig. 4-10 Drug permeability of PCL by thermal stimulation

4.2.6.2.2. 接触角

脂溶性物質と材料の疎水性相互作用といえば、材料の濡れ性、接触角の検証が必要と考えられる。薬剤も MNPs も内包していない PCL フィルム (No. 1) を 37°C および 45°C で 10 min プレインキュベーションし、それぞれの温度に保ったまま、ミリ Q 水着滴 5 sec 後の接触角を液滴法により測定した (Figs. 4-11, 4-12)。その結果、45°C 群がわずかに濡れにくくなっていることが示されたが、それほど大きな差ではなく、また、結晶-非晶相転移においては、PCL フィルム表面の粗さも変わってくることから¹⁷、濡れ性の温度依存性だけで本件を裏付けることは難しいと考えられた。

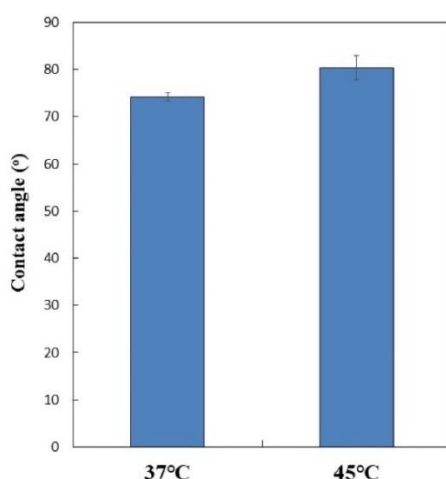


Fig. 4-11 Contact angle of PCL film at 37°C and 45°C

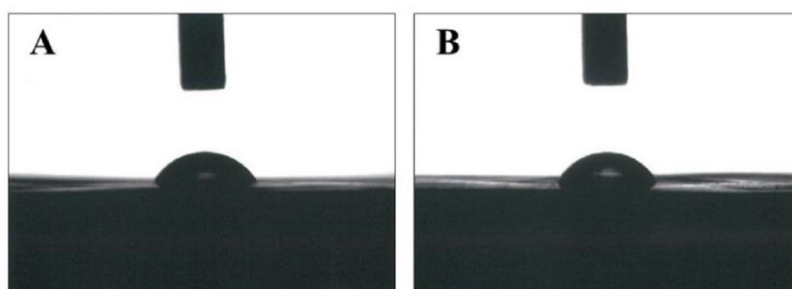


Fig. 4-12 Droplet photograph in contact angle test at (A) 37°C and (B) 45°C

4.2.6.2.3. アレニウスプロット

直接的な検証として、PTX の PCL フィルムに対する吸着親和性に温度依存性があるか検証した。薬剤も MNPs も内包しない PCL フィルム (No. 1, $\phi 4\text{ mm} \times t2\text{ mm}$) に、10 $\mu\text{g/mL}$ PTX および CBDCA の PBS 溶液を 0.1 mL 添加し、33-49°C で 1 hr 反応させた。上清の薬剤濃度を、セクション 3.4.1.2. で述べた HPLC 法で測定した。得られた結果から、縦軸に平衡定数 K の対数、横軸に

絶対温度 T の逆数をプロットし Fig. 4-13 に示した。ここで平衡定数は、 $K = (\text{PCL 吸着量}) / (\text{上清残存量})$ と定義した。その結果、PTX の PCL に対する吸着に温度依存性があることが示された。CBDCA ではそのような関係性は見られなかったので、脂溶性の高い PTX に特有の現象であると考えられた。CBDCA に関して、低温側から 1 番目 (33°C) と 2 番目 (37°C) のプロット間で急激な変化が見られたが、縦軸が対数であることと、PTX の 1/100 程度の値であることから、検証温度範囲において相対的にほとんど変化していないと見て差し支えないと考えられる。また、PTX に関して、アレニウスプロットの傾きが意味する、結晶-非晶相転移における活性化エネルギーの議論を想定して本検証を行ったが、明確な変曲点は見られなかった^{18,19}。

本検証により、温熱刺激により PTX の溶出が減少する事象を再現することができ、PTX と PCL の吸着相互作用に温度依存性があることが示された。しかしながら、なぜその吸着相互作用に温度依存性があるのか、根本的な部分でまだ解明には至っておらず、次セクションにて分配係数 $\log P$ の考察なども合わせ、更なる検証を行う。

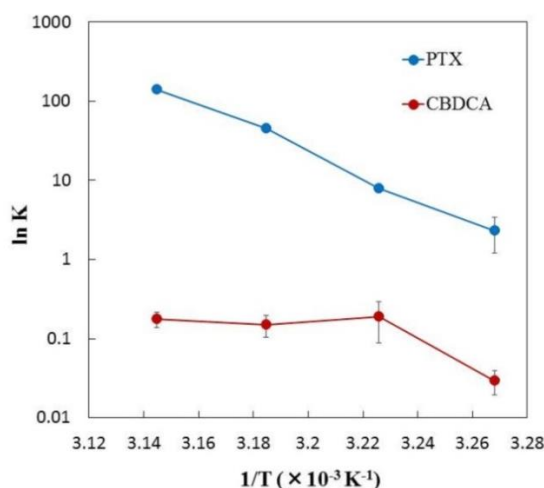


Fig. 4-13 Temperature dependence of drug adsorption on PCL film

4.2.6.2.4 分配係数検証

物質の脂溶性の指標として用いられるのが分配係数である。分配係数とは、対象物質が水と n-オクタノールなどの 2 相系において双方に分配される比率を意味し、温度、圧力が一定ならば分配係数は一定となる。一般的に、分配係数 $P = (\text{有機溶媒相の濃度}) / (\text{水相の濃度})$ で表され、さらに常用対数を用いて Eq. 4-1 のように表され、数値が大きいほど脂溶性が高いことを示す^{20,21}。

$$\log P = \Delta\mu^0 / 2.303 RT \quad (\text{Eq. 4-1})$$

このとき、 $\Delta\mu^0$ は水相および有機溶媒相における化学ポテンシャルの差 ($\mu_w^0 - \mu_o^0$)、 R は気体定数、 T は温度である。温熱刺激下において T が上昇すると $\log P$ が減少、つまり水相への分配率が上昇することから薬物放出はやはり増大すると考えられる。しかしながら、化学ポテンシャルも含めた詳細な考察を行うために、以下のように $\log P$ の測定を試みた。

$\log P$ の測定は、HPLC 法を用いた^{22,23}。HPLC、特に ODS 等の逆相カラムを用いることで非極

性固定相と極性移動相の界面において試料の分配が起こり、 $\log P$ を強く反映した結果が得られる²²。リファレンス試薬として、dichloromethane ($\log P$: 1.25)、toluen ($\log P$: 2.69)、*p*-xylene ($\log P$: 3.12) を用いた。Acetonitrile を用いて、それぞれ 1% 溶液を調製し、被験物質である 10 $\mu\text{g/mL}$ PTX 溶液と共に、各 20 μL を流速 1.0 mL/min でカラムに注入した。カラムは、CAPCELL PAK C18 UG120 (5 μm , 4.6 mm I.D. \times 250 mm) を、HPLC 装置 Elite LaChrom に装着して用いた。移動相は 60% acetonitrile のイソクラティック溶出とし、カラムオーブンは 33-49°C に変化させ、吸光度 210 nm にて検出した。その結果、横軸に温度、縦軸に容量因子 k の変化率をプロットして、Fig. 4-14 に示した。ここで、容量因子とは Eq. 4-2 で定義される、HPLC の相対的な溶出時間である²²。

$$k = (t_r - t_0) / t_0 \quad (\text{Eq. 4-2})$$

このとき、 t_r は試料の溶出時間、 t_0 はいわゆる dead-volume で溶媒の溶出時間であり、通常はこの容量因子 k と既知の試薬の $\log P$ から検量線を作成し、被験物質の $\log P$ を算出する。容量因子 k の値が小さいほど、対象物質の溶出時間が早い、つまり水相により分配されることを意味する。しかしながら、本研究のように温度を変化させた系においては、リファレンス試薬の $\log P$ も変わってしまうため、正確な予測・算出が出来ないと考えられた。そこで、Fig. 4-14 に示したように、33°C 条件における各試薬の容量因子 k を基準として、温度を上昇させた際のその変化の割合を比較した。その結果、PTX 以外の試薬はすべて同等の温度依存性を示したが、PTX は温度が上昇しても容量因子 k の減少が緩やかで、水相に分配される割合が他の試薬よりも低いことが示唆された。言い換えれば、リファレンス試薬の容量因子 k が、温度上昇と共に一様に減少しているので、PTX の $\log P$ は相対的には増大しているとも言えることができ、本研究における PTX と PCL の吸着相互作用の温度依存性を反映した結果であると考えられた。

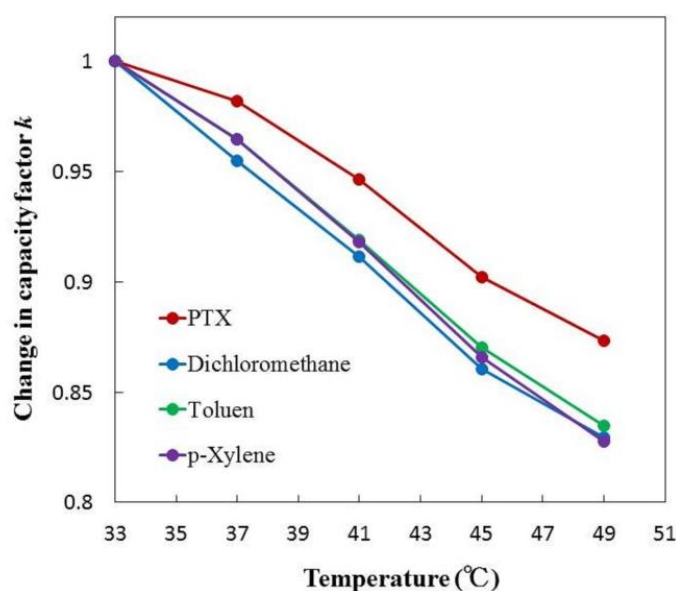


Fig. 4-14 Change in capacity factor “ k ” of each reagent at various temperatures

4.2.6.3. カルボプラチン (CBDCA)の測定結果

MNPs も温熱刺激も加えないフィルムと比較して、温熱刺激下では有意差なしのほぼ同等の溶出を示したが、MNPs 添加フィルムからの溶出は極めて減少した。MNPs 内包および温熱刺激で、放出は増大すると予想していたため、本事象の要因となっている相互作用に関しても、次章で詳細に検証する。

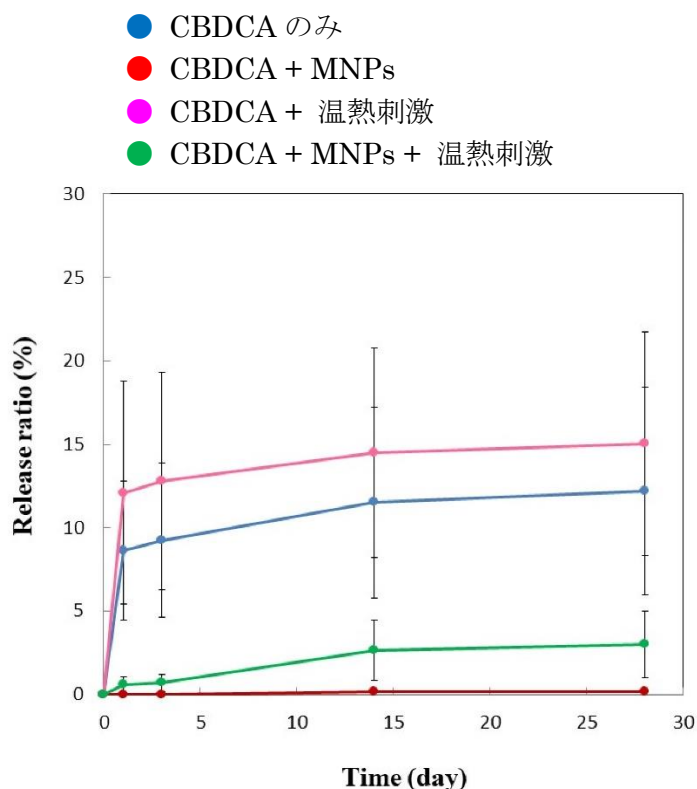


Fig. 4-15 Release profile of CBDCA with or without MNPs loading at 37°C or 45°C

4.2.6.4. MNPs 添加により CBDCA の溶出が減少する事象について

4.2.6.4.1. 再現実験

Fig. 4-15 の結果から、MNPs が内包された条件での CBDCA の溶出が極端に減少する状況から判断して、CBDCA と MNPs との相互作用である可能性が疑われた。まずは本現象を再現して検証するために、Fig. 4-16 に示したようなシンプルな系を構築した。その理由として、フィルム内には PCL の他、未反応の benzoyl peroxide など残存していると考えられ、起こり得る相互作用を検証するためには、それらを含まないシンプルな系で行う必要があったためである。

1.5 mL マイクロテストチューブに MNPs 5 mg、DMF 100 μ L、1 mg/mL の CBDCA または PTX 50 μ L を添加して混合し、フィルム合成時と同じ 80°C で 3 hr 反応させた。上清の薬剤濃度を、セクション 3.4.1.2. で述べた HPLC 法で測定した。コントロールとして、MNPs を添加しない以外は同

様に調製した反応上清も用いた。その結果、MNP_s 存在下での CBDCA の上清が顕著に減少しており、何らかの相互作用が起こっていることが改めて示唆された (Fig. 4-17)。

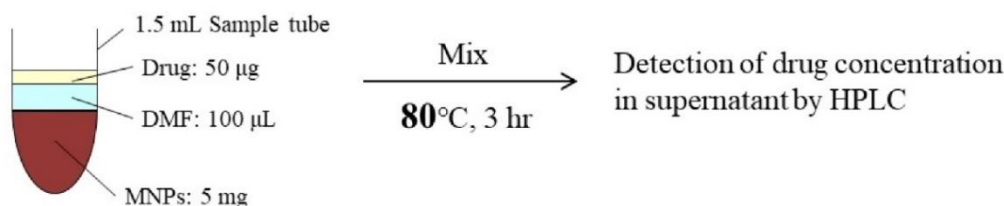


Fig. 4-16 Schematic illustration of protocol of reproduction test to evaluate the interaction between MNP_s and CBDCA

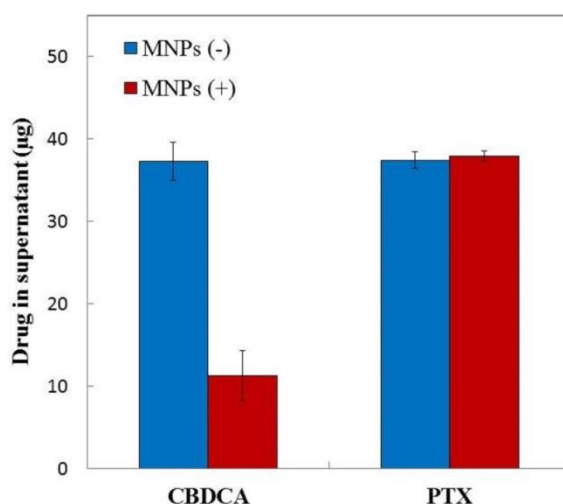


Fig. 4-17 The amount of drug in supernatant with or without MNP_s loading

4.2.6.4.2. フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)

MNP_s と CBDCA との間に働く相互作用を検証するため、セクション 4.2.6.4.1.と同様に調製した反応上清を蒸発乾固し、KBr 錠剤法を用いた FT-IR で分析した。コントロールとして、MNP_s を添加しない以外は同様に調製した反応上清も用いた。Fig. 4-18 に測定全波数領域 (500-4000 cm^{-1})の結果を示し、また、高波数領域は水素結合によるブロード化のため解析難であることから、Fig. 4-18 図中の緑枠エリア (800-2000 cm^{-1})の拡大図を Fig. 4-19 に示した。加えて文献 No. 24-26 により、各ピークの帰属を Fig. 4-19 の図中に示した²⁴⁻²⁶。

基本的にこの実験系で検出されるのは CBDCA 由来のピークと考えられるが、反応上清を蒸発乾固しているため、揮発性の DMF 由来のピークが観察されるとすれば、DMF による何らかの相互作用も示唆されることになる。それらを踏まえ Fig. 4-19 の結果を観察すると、MNP_s 添加条件の試料において、1714 cm^{-1} および 1223 cm^{-1} に顕著なピークの出現が認められ、それぞれカルボ

ン酸由来 C=O 伸縮振動、および C-N アミドⅢバンドに帰属すると考えられた。この状況においてカルボン酸が出現したとなれば、Fig. 3-4 で示した CBDCA の分子構造のうち、いわゆる脱離基と呼ばれる 1,1-cyclobutane dicarboxylic acid が分解、脱離している可能性が示唆され、また、アミドは DMF 由来と考えるのが妥当と思われた。本考察を検証するため、次セクションにて更なる分析を加える。

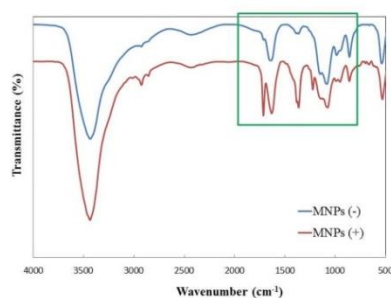


Fig. 4-18 FT-IR analysis of CBDCA with or without MNPs loading

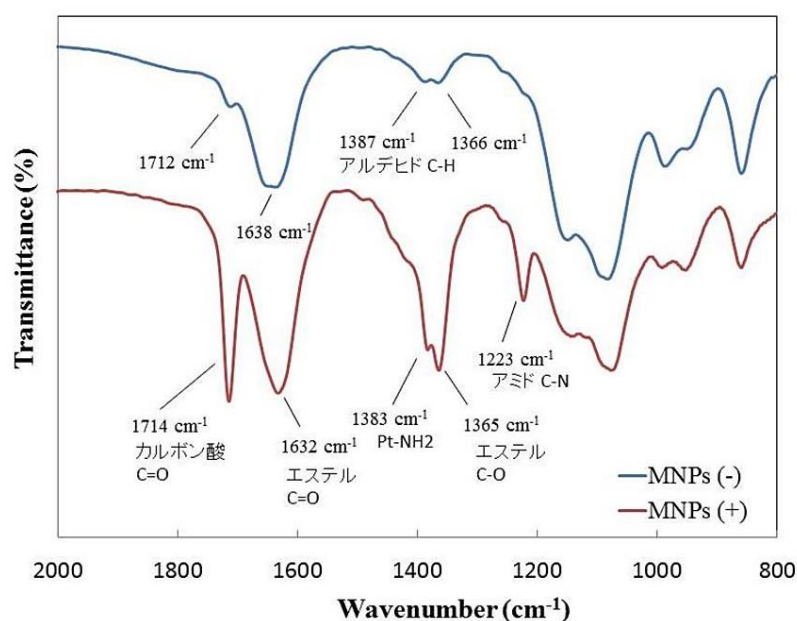


Fig. 4-19 FT-IR analysis of CBDCA (enlarged green frame in Fig. 4-18)²⁴⁻²⁶

4.2.6.4.3. 相互作用メカニズムの検証

前セクション 4.2.6.4.2.において、MNPs と CBDCA の相互作用の結果、CBDCA の分解が示唆された。しかしながら、まだ実験系にカルボン酸の存在が示唆されただけに過ぎないため、更なる検証を加えることにより、本仮説の裏付けを行った。

セクション 4.2.6.4.1.と同様に調製した反応上清を、HPLC を用いて精密分析を行った。ただし、反応温度 80℃、3 hr のところを 4℃、37℃、50℃、80℃と変化させて試料調製した (反応時間は変更なし)。HPLC 条件は、Kato らの白金化合物分析プロトコールに従い、以下のように行った²⁷。

カラムは、CAPCELL PAK C18 UG120 (5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm)を、HPLC 装置 Elite LaChrom に装着して用いた。移動相は、100 mM sodium perchlorate / acetonitrile / 100 mM perchloric acid = 290 : 10 : 3 (v/v/v)を用いたイソクラティック溶出とし、上述の反応上清 20 μ L を流速 1.0 mL/min で注入した。カラムオーブンは 37°C に維持し、吸光度 225 nm にて検出した。

Fig. 4-20 にそのクロマトグラムを示した。溶出時間約 2.7 min および 4.2 min に温度依存性を示すピークが検出された。溶出時間約 4.5 min 以降の振り切れている大きなピークは、DMF 由来のものである。また、CBDCA のリファレンス試料の結果より、溶出時間 4.2 min が CBDCA を示し、2.7 min は Kato らの報告によれば None-chloro form cisplatin (NCFC) に相当する²⁷。NCFC とは、Fig. 4-22 に示したように、シスプラチンの Cl が溶媒による分解のために 2 つとも脱離して生成した物質で (本研究では水ではなく DMF が配位子になっていると考えられる)、本分析条件を用いれば、カチオン化した NCFC が移動相中の perchlorate とイオンペアを形成して電荷が相殺された形となり、固定相との疎水相互作用が引き起こされる²⁸。しかしながら、Kato らによれば、固定相が ODS の場合はこの相互作用が起きにくく、NCFC は ODS カラムを flow through して void 分画に検出される²⁷。一方で CBDCA は、1,1-cyclobutane dicarboxylic acid が示す疎水性相互作用により分離・保持され、溶出時間 4.2 min に検出されたと考えられる。この NCFC は、CBDCA の分解物、つまり、1,1-cyclobutane dicarboxylic acid が脱離して生じる物質の構造に等しく、また、Fig. 4-21 より、2.7 min のピークと 4.2 min のピークの存在割合は、互いに反比例するように、温度依存的に変化していることから、CBDCA が MNPs との相互作用により分解されている可能性が示唆された。

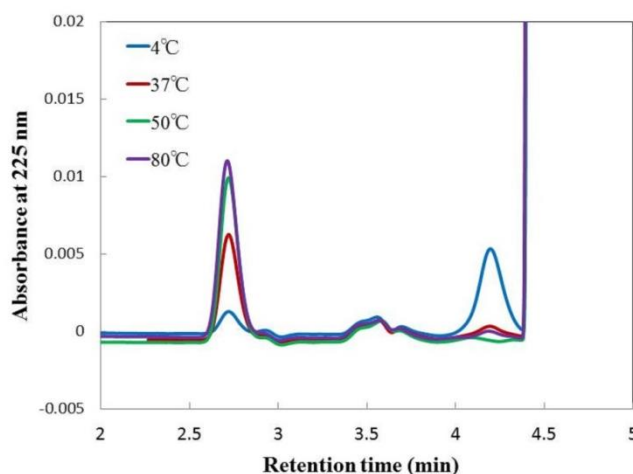


Fig. 4-20 Chromatographic analysis of the interaction between MNPs and CBDCA at various temperatures

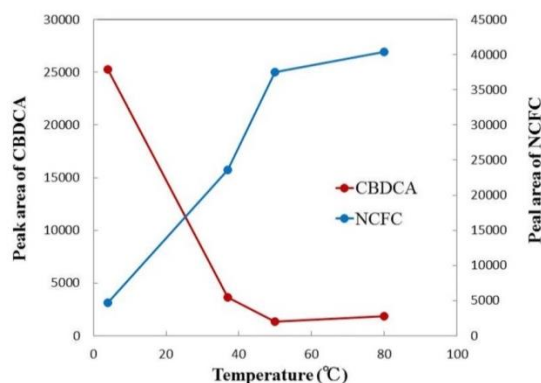


Fig. 4-21 Change in peak area of CBDCA and NCFC in the chromatogram shown in Fig. 4-20

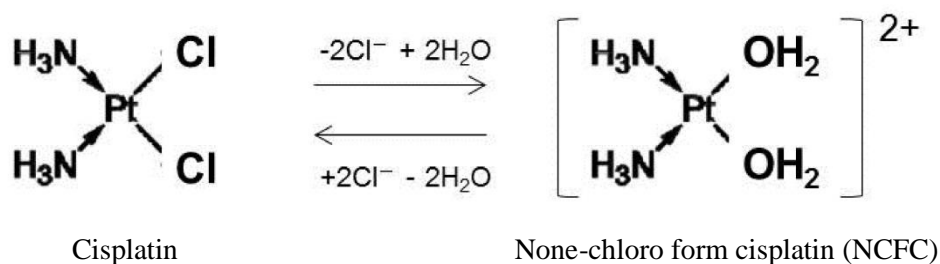


Fig. 4-22 Schematic illustration of cisplatin hydrolysis

以上を踏まえ、CBDCA と MNPs の相互作用反応機構は、Fig. 4-23 で示したように、MNPs の活性化した酸化鉄表面が CBDCA を順次攻撃し、分解が進行していくのではないかと考えられた^{13,29}。反応上清中にカルボン酸が検出されたことから、Fig. 4-23 の分解機構において、この反応のトリガーとなるのは、MNPs の表面水酸基がエステルのカルボニル炭素を攻撃する求核アシル置換反応ではなく、CBDCA の Pt (II) を攻撃する SN2 反応であると考えられた。また、片方の脱離基が外れた CBDCA は非常に不安定となるため、脱離反応はさらに進行していき、最終的には 1,1-cyclobutane dicarboxylic acid が完全に脱離するものと考えられる。CBDCA やシスプラチンなどの白金製剤の脱離基は、薬剤が腫瘍細胞の膜内に浸透するための重要な役割を果たしている³⁰。それゆえ、抗腫瘍効果を十分に発揮するためには、脱離基は腫瘍細胞内で解離する必要があるため、材料中の MNPs と相互作用してしまうことは避けなければならない。これを回避または改善する方法はいくつか考えられるが、次のセクションでまとめる。

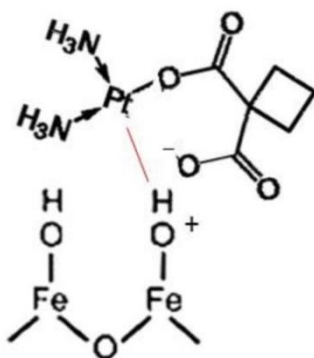


Fig. 4-23 Schematic illustration of the interaction between MNPs and CBDCA

4.3. 第4章のまとめ

以上、第4章で得られた知見を以下にまとめた。

Table 4-5 Summary of Chapter 4

	第2章	第3章	第4章
	無機材料	有機材料	無機－有機複合体
基材	リン酸カルシウム骨ペースト	ポリカプロラクトン (PCL)	磁性ナノ粒子－PCL複合体
薬剤	バンコマイシン ゲンタマイシン	パクリタキセル カルボプラチン	パクリタキセル カルボプラチン

- ・ PTX および CBDCA を内包した、MNPｓ－PCL 複合化フィルムを合成した。
- ・ 温熱刺激下 (45℃)で、PTX－PCL 吸着相互作用が観察された。
- ・ PTX の分配係数の温度依存性が低く、水相へ分配しにくいことが示唆された。
- ・ MNPｓ－CBDCA 相互作用が観察された。
- ・ MNPｓ 表面の水酸基が CBDCA を分解する可能性が示唆された。

4.4. 効果的な材料設計への提言

本研究において得られた知見から、効果的な材料設計への提言をまとめた。

Table 4-6 Proposal for effective material design

	起こりうる相互作用	対策
CPC等無機セメント材料を用いた系	内包する薬剤の種類や数により気孔構造が変化する。	原料粉体の粒径を変えるなどして、気孔構造の制御が可能。
結晶性ポリマーを用いて薬物放出を制御する系	薬剤の内包により結晶性が低下する。想定より薬物放出増大で、細胞毒性等の危険性あり。	事前に結晶性を慎重にモニターし、薬物放出との相関を把握する。
PTX等脂溶性の高い薬剤の内包	温熱環境にてポリマー材料に吸着の可能性。	薬物放出のトリガーを温熱以外とする。共存物質等で結晶性を下げることが可能。
CBDCA等白金製剤の内包	MNPｓ等の活性化表面と反応し分解する可能性。	MNPｓと薬剤を共存させず分けて使用。フィルム合成後に薬剤を内包してもよい。

4.5. 敢えて One-pot 型にしないという選択肢

上記提言中に示されたように、薬剤－材料間の相互作用を避けるために、敢えて One-pot 型にしないという選択肢も考えられる。これは具体的にはどういうことなのか、以下に説明し実証する。

これまで、薬剤、MNPs、ポリマーを One-pot 型にすることで、温熱療法と化学療法を同時に作用させることを実現してきたが、CBDCA のような白金製剤が機能せず、それが MNPs との相互作用が原因であると明らかになってきたことから、Fig. 4-24 で示したように、MNPs を内包する温熱療法用フィルムと、MNPs を内包しない化学療法用フィルムとに分けて使用することを提案するものである。分けて使用するのは、腫瘍細胞に対して並べて貼る、重ねて貼る、挟むなどを意味する。

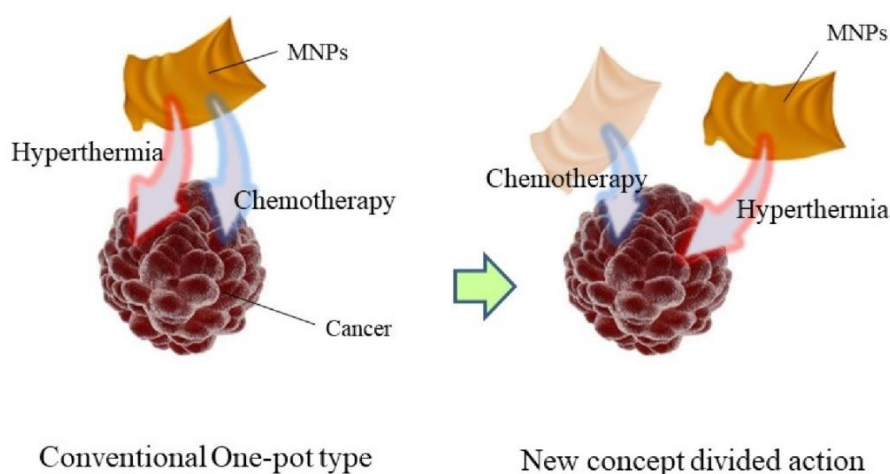


Fig. 4-24 New concept to separate materials for chemotherapy and hyperthermia

Fig. 4-24 のように、One-pot 型にしないという New concept を採用することで、CBDCA の薬物放出が改善するか検証した。Fig. 4-25 左図のように、

- CBDCA を内包せず MNPs を内包するフィルム (No. 2)
- CBDCA を内包し MNPs を内包しないフィルム (No. 5)

の 2 枚のフィルムを New concept として共存させ、

- CBDCA を内包し MNPs も内包するフィルム (No. 6)

を従来の One-pot 型として用いた。In vitro 薬物放出試験を行い、45℃、24 hr における上清中の CBDCA 濃度を、HPLC 法で検出した。その結果を Fig. 4-25 右図に示したが、New concept として、温熱療法用フィルムと化学療法用フィルムを分けて使用することで、CBDCA の溶出を改善できることが示された。

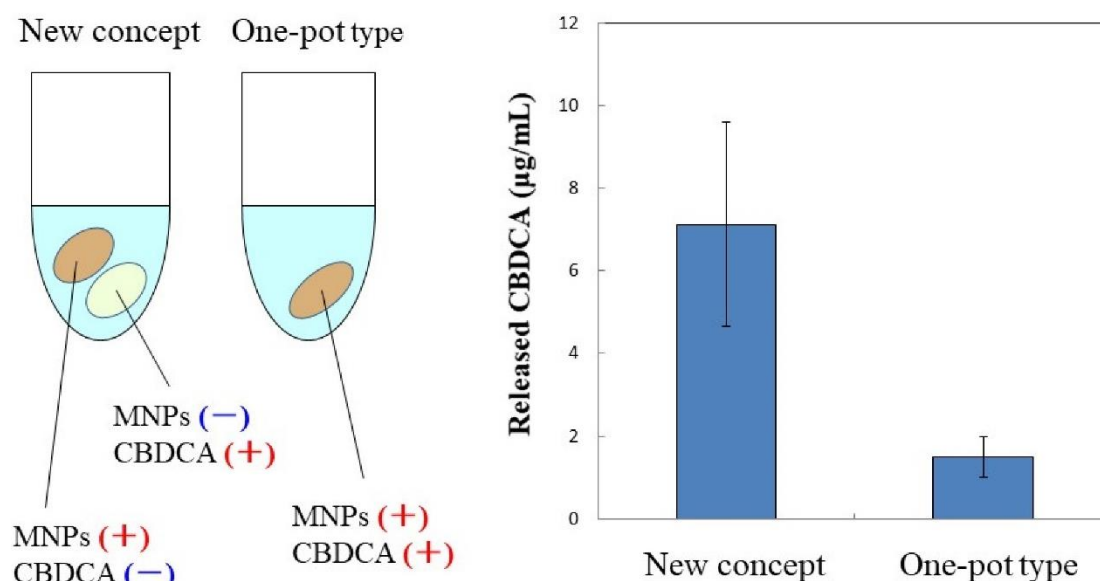


Fig. 4-25 Release profile of CBDCA by separating chemotherapy and hyperthermia

4.6. 参考文献

- 1 井藤彰; 本多裕之; 小林猛, パーティクルと DDS リポソームを用いた腫瘍への薬剤ターゲティング. *Drug Delivery System* **2002**, 17, 347-354.
- 2 がんの補完代替療法 クリニカル・エビデンス 2016 年版, 金原出版.
- 3 Kim, Y. J.; Ebara, M.; Aoyagi, T., A smart hyperthermia nanofiber with switchable drug release for inducing cancer apoptosis. *Advanced Functional Materials* **2013**, 23, 5753-5761.
- 4 川畑幸嗣, がん温熱療法. *ドクターサロン* **2015**, 59, 39-43.
- 5 特許流通支援チャート 化学 28 ドラッグデリバリーシステム, 工業所有権情報・研修館.
- 6 中山正道, 温度応答性薬物キャリア ダブルターゲティング: 薬物と医療機器テクノロジーの融合. *Drug Delivery System* **2010**, 25, 483-492.
- 7 異島優; 丸山徹; 石田竜弘; 小田切優樹, 内因性アルブミン輸送システムを利用した腫瘍選択的 NO 供与による EPR 効果の制御. *Drug Delivery System* **2018**, 33, 130-138.
- 8 Matsumura, Y.; Maeda, H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research* **1986**, 46, 6387-6392.

- 9 Caracciolo, G., Clinically approved liposomal nanomedicines: lessons learned from the biomolecular corona. *Nanoscale* **2018**, *10*, 4167-4172.
- 10 Uto, K.; Yamamoto, K.; Hirase, S.; Aoyagi, T., Temperature-responsive cross-linked poly(ϵ -caprolactone) membrane that functions near body temperature. *Journal of Controlled Release* **2006**, *110*, 408-413.
- 11 Niiyama, E.; Uto, K.; Lee, C. M.; Sakura, K.; Ebara, M., Alternating magnetic field-triggered switchable nanofiber mesh for cancer thermo-chemotherapy. *Polymers* **2018**, *10*, Article ID 1018.
- 12 北川隆啓, 分離精製用磁性粒子. 三洋化成ニュース **2016**, *494*, 1-4.
- 13 渡辺春夫, 磁性粉体の表面化学. 岩手表面技術懇話会 第9回表面技術セミナー **1993**.
- 14 田村紘基; 大喜多鋼冶; 片山則昭; 古市隆三郎, 酸化鉄(III)粒子表面への二価重金属イオン吸着反応のモデル化. *分析化学* **1994**, *43*, 831-836.
- 15 ブリストル・マイヤーズ スクイブ株式会社, タキソール®注射液 インタビューフォーム.
- 16 Uto, K.; Yamamoto, K.; Hirase, S.; Aoyagi, T., Temperature-responsive cross-linked poly(ϵ -caprolactone) membrane that functions near body temperature. *Journal of Controlled Release* **2006**, *110*, 408-413.
- 17 Uto, K.; Aoyagi, T.; DeForest, C. A.; Ebara, M., Dynamic alterations of hepatocellular function by on-demand elasticity and roughness modulation. *Biomaterials Science* **2018**, *6*, 1002-1006.
- 18 藤森裕基; 小國正晴, 過冷却液体におけるスローダイナミクスの熱的特性化. *Netsu Sokutei* **1996**, *23*, 60-69.
- 19 田村珠美; 金澤幸雄; 中野修, ゴム材料の寿命評価技術. *東芝レビュー* **2015**, *70*, 40-43.
- 20 藤原英明, 新しい疎水性パラメータ. *生産と技術* **1993**, *45*, 72-74.
- 21 横田勇, 分配係数の理論的予測法. *水質汚濁研究* **1989**, *12*, 250-257.
- 22 Partition coefficient (n-octanol/water), high performance liquid chromatography (HPLC) method. OECD Guideline for testing of chemicals 117.
- 23 木曾祥秋; 平野智己; Jung, Y. J., 簡易な log P 測定法による高疎水性有機化合物の log P 値の評価. *EICA* **2008**, *13*, 69-72.
- 24 Iliescu, R. I.; Andronescu, E.; Ghitulica, C. D.; Berger, D.; Ficai, A., Montmorillonite-alginate nanocomposite beads as drug carrier for oral administration of carboplatin - preparation and

characterization. *UPB Scientific Bulletin Series B* **2011**, 73, 3-16.

- 25 森戸延行; 末高治; 下平三郎, MgO へのジメチルホルムアミドおよびジメチルスルホキシドの吸着. *材料* **1970**, 19, 597-602.
- 26 IR Spectrum Table & Chart. Sigma-Aldrich web site,
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html>
- 27 Kato, R.; Sato, T.; Kanamori, M.; Miyake, M.; Fujimoto, A.; Ogawa, K.; Kobata, D.; Fujikawa, T.; Wada, Y.; Mitsuishi, R.; Takahashi, K.; Imano, H.; Ijiri, Y.; Mino, Y.; Chikuma, M.; Tanaka, K.; Hayashi, T., A novel analytical method of cisplatin using the HPLC with a naphthylethyl group bonded with silica gel (πNAP) column. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2017**, 40, 290-296.
- 28 岩切進; 浅川直樹; 宮川剛; 三宅康夫, 蛋白の高速液体クロマトグラフィー (第6報) 逆相高速液体クロマトグラフィーによるマッコウクジラ及びウマのミオグロビンの分離. *薬学雑誌* **1986**, 106, 265-267.
- 29 ブリストル・マイヤーズ スクイブ株式会社, パラプラチン® 注射液インタビューフォーム.
- 30 千熊正彦; 佐藤卓史; 米田誠治, 次世代白金抗がん薬開発の現状. *YAKUGAKU ZASSHI* **2008**, 128, 307-316.

第 5 章

結 言

本論文では、将来的なコンビネーション化学療法を見据え、医療材料の複合化や多剤内包により起こり得る相互作用に着目した。無機材料、有機材料、無機-有機複合材料のカテゴリーに分け、それぞれにおける薬物放出や相互作用を検証し、効果的な材料設計への提案を行うことを目的とした。

第1章では、本学位研究の動機となった多剤併用療法およびコンビネーションプロダクトに関する背景を示した。材料間の複合体もしくは多剤内包することで起こり得る相互作用も複雑になると予想され、本研究の意義と目的を示した。

第2章では、無機材料を用いた薬物放出として、リン酸カルシウム骨ペースト (CPC)を用いた薬物放出特性を検証した。CPC の場合は気孔径の影響が極めて大きいことから、専用液剤に対する薬剤の溶解性や、薬剤分子の大きさと気孔径との大小関係などを慎重にモニターする必要性が示された。また、原料粉体の粒径を制御することで気孔径をアレンジすることが可能であり、例えば原料粉体の粒径を大きく調製すれば薬物放出を加速できるなど、薬物放出を能動的にコントロールできるようになると考えられた。

一方で、医療材料はCPCのような無機材料の他にもポリマーや金属など様々あり、材料が変わればまた違った相互作用も現れると予想された。特に将来的にCPCとの複合化による相乗効果を期待した場合、ポリマー材料は他の素材よりも設計および成形などが容易であると推測され、その薬物放出挙動を検証することは非常に興味深いと考えられた。しかしながら、既存のポリメチルメタクリレート系セメント材料の薬物放出は極めて低く、硬化後の加工性や操作性は乏しかった。ポリマー材料には原則気孔という概念が存在せず、一般的にはその非晶相からの染み出しという、CPCとはまったく異なった薬物放出機構を持つことから、ポリマー材料を用いて薬物放出を制御する系においては、結晶性のアレンジや、温度などそのトリガーとなる刺激種、さらには生体に影響のない環境下で実施できるか考慮する必要がある。また、そこに薬剤を内包させることで起こり得る相互作用も考慮する必要がある、これらを検証していくことは、将来的なコンビネーション化学療法を実現していく上で、極めて有意義であると考えられた。

第3章では、有機材料を用いた薬物放出としてパクリタキセル (PTX)およびカルボプラチン (CBDCA)を内包したポリカプロラクトン (PCL)フィルムを合成し、その物性評価を行った。生体内温度付近の約40℃で結晶-非晶相転移を示し、それに伴い薬物放出を加速させるポテンシャルを有するスマートフィルムの作製に成功した。In vitro 薬物放出試験の結果、2剤内包PCLフィルムの結晶性が低下し、薬物放出を増大するポテンシャルも観察された。

第4章では、無機-有機複合材料を用いた薬物放出として、磁性ナノ粒子 (MNPs)-PCL 複合フィルムを合成した。In vitro 薬物放出試験の結果、PTX は温度依存的にPCLフィルムに吸着することを確認し、温熱刺激との共存は避けるべきとの提言を行った。またCBDCAは、MNPsとの反応で分解する可能性が示唆された。しかしながら、MNPsとの共存を避ける、つまり温熱療法用フィルムと化学療法用フィルムを分けて作製することや、薬剤はフィルム合成後に内包させるといった対策を提言することができた。

近年、特にがん治療では、抗がん剤が単独で投与されることは少なく、多剤併用療法が一般化しており、医療材料との併用においてもこの傾向は加速されていくものと考えられる。CPCなどの無機材料では、気孔構造の変化により薬物放出が制限される場合もあり、将来的にスマートポリマーとの複合化の可能性も考えられ、その必要性に遭遇したとき、物質の相互作用の考え方、現象を正しく見る目など、本学位研究で得た経験を活かしていきたいと考えている。

【発表リスト】

本研究は、以下に示す論文において発表され、また早期修了プログラム審査要件として、以下の論文が適用された。

【発表論文 (Proceedings 含む)】

- 1 **Ken Sugo**, and Mitsuhiro Ebara, “A Simple Spectrophotometric Evaluation Method of Hydrophobic Anticancer Drug Paclitaxel”, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, in press.
- 2 **Ken Sugo**, Sosuke Ouchi, and Mitsuhiro Ebara, “Simultaneous Control of Paclitaxel and Carboplatin Release Using Smart Films”, in preparation.

【早期修了プログラム審査要件】

1. **Ken Sugo**, and Tsuneo Okuyama, “Hydroxyapatite Chromatographic Procedures for Phospholipids”, *Separation Science and Technology*, 53 (2), 389-396, (2018)
2. **Ken Sugo**, and Tsuneo Okuyama, “Hydroxyapatite Chromatographic Procedures for Phospholipids: Endotoxin Purification Methods”, *Separation Science and Technology*, 53 (10), 1572-1579, (2018)
3. **Ken Sugo**, Ryota Kawashima, Masanori Nakasu, and Takehiko Nakajima, “Antibiotic Elution Profile and Physical Properties of a Novel Calcium Phosphate Cement Material”, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 124 (9), 954-958, (2016)
4. **Ken Sugo**, Tomohiko Yoshitake, Masahiro Tomita, Shintaro Kobayashi, Yae Kurosawa, Katsumi Kawamura, and Tsuneo Okuyama, “Simplified Purification Soluble Histidine-Tagged Green Fluorescent Protein from Cocoon of Transgenic Silkworm in Metal Affinity Hydroxyapatite Chromatography”, *Separation and Purification Technology*, 76, 432-435, (2011).

【謝辞】

筑波大学 早期修了プログラムによる社会人学生の受け入れを快くお引き受け下さり、本研究を遂行するにあたっては、終始温かく多大なるご指導とご鞭撻を賜りました、筑波大学大学院 数理工学専攻 准教授 荏原充宏 博士に心より感謝申し上げます。

本論文の執筆にあたり、ご指導・ご助言を賜りました、筑波大学大学院 数理工学専攻 教授 陳 国平 博士、教授 長崎幸夫 博士、教授 田口哲志 博士、教授 内藤昌信 博士に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、一般の学生と同じ様に温かく受け入れ支えて下さいました、物質・材料研究機構 主任研究員 宇都甲一郎 博士、主任研究員 Wenjing Meng 博士、荏原研究室の皆様 Mingwei Mu 博士、柘植美礼 氏、矢野宥人 氏、Elfire Polat 氏、Mazaya Najmina 氏、Jeonggyu Lee 氏、高橋叶子 氏、弘中啓太 氏、山本理恵 氏、安瀬地千奈実 氏、Wei Shun Huang 博士、Zih-Cheng Su 氏、Chris Arakawa 博士、Yihua Liu 博士、鷹觜聖人 氏、Yue Liang 氏、和田祐輝 氏、中川泰宏 博士、栗本理央 博士、野村奈生人 氏、田辺貫太 氏に心より感謝申し上げます。

また、同時期に博士論文を執筆する同志として互いに切磋琢磨し、時に励まし支えて下さいました、新山瑛理 博士に心より感謝申し上げます。

並びに相棒として本研究を支えて下さり、共に成長させていただきました、大内創介 氏に心より感謝申し上げます。

社会人学生の受け入れに際し、イレギュラーな事務手続きなど、幅広く支えて下さいました、伊藤芳江 氏に心より感謝申し上げます。

本研究は、筑波大学 社会人のための博士後期課程 早期修了プログラムの履修により遂行されたものであり、本プログラムがあつてこそ会社業務との両立および有意義な1年半を過ごすことが出来たことを、プログラム運営委員、事務担当、数理工学専攻エリア支援室、並びに物質・材料工学専攻の職員の皆様に心より感謝申し上げます。

筑波大学 早期修了プログラムの出願に際し、貴重なご指導・ご助言を賜りました、筑波大学大学院 数理工学専攻 教授 川上亘作 博士、並びにときわバイオ株式会社 中須麻子 博士に心より感謝申し上げます。

会社業務において、多剤併用療法の意義やその検証の重要性をご指導・ご助言下さり、学位研究を志すきっかけを与えて下さいました、北里大学医学部整形外科学 教授 占部 憲 博士に心より感謝申し上げます。

会社業務において、研究者が論文を執筆することの重要性、並びにその執筆の基礎をご指導下さり、学位研究を志す礎を築いて下さいました、元東京都立大学 名誉教授 故 奥山典生 博士に心より感謝申し上げます。

また、学位研究を志すことができる研究者として成長させて頂き、業務と学位研究の両立を暖

かく見守って頂きました、HOYA Technosurgical 株式会社の皆様に心より感謝申し上げます。

学士課程当時、研究者としての道を志すきっかけとその礎を築いて下さいました恩師、元東京都臨床医学総合研究所 副参事 羽里忠彦 博士、並びに元東京理科大学 副学長 植木正彬 博士に心より感謝申し上げます。

最後に、家族、親戚をはじめ、会社関係者、先輩、同僚、後輩、友人、先生、私のこれまでの人生において関わり、支えて下さいましたすべての皆様に心より感謝申し上げます。

2019 年 7 月

菅生 健