

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）

がんの局所薬物療法を目指した
スマートナノファイバーの創製

新山 瑛理

物質・材料工学専攻

目次

第1章 緒言	5
1-1 今日の医薬品開発の現状	5
1-2 Drug Repositioning(DR)とは	5
1-3 Drug Delivery System(DDS)とは	6
1-4 全身化学療法と局所化学療法	7
1-5 局所薬物徐放と dose-dense therapy による薬効向上	8
1-6 温熱療法による薬効の向上.....	9
1-8 臨床における治療法の選択.....	11
1-9 本論文における主題と構成.....	11
参考文献.....	12
第2章 抗がん剤の長期徐放を実現するナノファイバーの設計	15
2-1 緒言	15
2-1-1 Paclitaxel (PTX)	15
2-1-2 Poly(ϵ -caprolactone)(PCL)とは.....	15
2-2 実験方法.....	15
2-2-1 試薬	15
2-2-2 Poly(ϵ -caprolactone)の 合成	17
2-2-3 電界紡糸法および構造評価の方法	17
2-2-4 薬物放出試験方法	17
2-2-5 細胞実験方法	18
2-2-6 動物実験方法	19
2-3 実験結果.....	19
2-3-1 合成した PCL の構造評価.....	19
2-3-2 ナノファイバーの構造評価	20
2-3-3 薬物放出試験結果	21
2-3-4 細胞実験結果	21
2-3-5 動物実験結果	23

2-4 結言	25
参考文献.....	26
第3章 薬物徐放と温熱療法との併用を可能にするナノファイバーの設計	27
3-1 緒言	27
3-2 実験方法	27
3-2-1 実験試薬	27
3-2-2 電界紡糸法	28
3-2-3 ナノファイバーの構造評価方法	28
3-2-4 交流磁場照射時の発熱挙動評価方法	29
3-2-5 薬物放出試験方法	29
3-2-6 温熱と薬物の <i>in vitro</i> 抗腫瘍評価方法	29
3-2-7 ナノファイバーを用いた <i>in vitro</i> 抗腫瘍評価方法.....	31
3-2-8 動物実験方法	31
3-3 実験結果	32
3-3-1 ナノファイバーの構造評価	32
3-3-2 交流磁場照射時の発熱挙動評価	32
3-3-3 薬物放出評価	35
3-3-4 温熱と薬物の抗腫瘍評価.....	37
3-3-5 ナノファイバーを用いた <i>in vitro</i> 抗腫瘍評価	38
3-3-6 動物実験評価	39
3-4 結言	41
参考文献.....	42
第4章 薬物の ON-OFF 放出と温熱療法を可能にするナノファイバーの設計	43
4-1 緒言	43
4-1-1 Poly(<i>N</i> isopropylacrylamide) とは.....	43
4-2 実験方法	43
4-2-1 実験試薬	43
4-2-2 Poly(<i>N</i> isopropylacrylamide- <i>co</i> - <i>N</i> hydroxymethylacrylamide)の合成と構造評価方法	44

4-2-3	ナノファイバーの作製と構造評価方法	45
4-2-4	ナノファイバーの熱架橋方法.....	45
4-2-5	ナノファイバーの膨潤・収縮挙動評価方法.....	45
4-2-6	交流磁場照射時の温熱挙動評価方法	46
4-2-7	薬物放出評価	46
4-2-9	ナノファイバーを用いた <i>in vitro</i> 抗腫瘍評価方法	46
4-2-10	動物実験方法	47
4-3	実験結果	47
4-3-1	Poly(N-isopropylacrylamide- <i>co</i> -hydroxymethylacrylamide)の合成と構造評価	47
4-3-2	作製したナノファイバーの構造評価	49
4-3-3	ナノファイバーの熱架橋評価.....	50
4-3-4	ナノファイバーの膨潤・収縮挙動評価	50
4-3-5	交流磁場照射時の温熱挙動評価	51
4-3-6	薬物放出評価	52
4-3-7	ナノファイバーを用いた <i>in vitro</i> 抗腫瘍評価	53
4-3-8	動物実験評価	54
4-4	結言	54
	参考文献.....	55
第5章	ナノファイバーの生分解性制御.....	56
5-1	緒言	56
5-2	実験方法	56
5-2-1	実験試薬	56
5-2-2	ファイバーとフィルムの作製方法および構造評価方法.....	56
5-2-3	DSC 測定方法.....	58
5-2-4	接触角測定方法.....	58
5-2-5	分解性試験方法.....	58
5-3	実験結果	58
5-3-1	ブレンド PCL のキャストフィルムおよびファイバーの構造評価.....	58

5-3-2 DSC 測定.....	61
5-3-3 接触角試験結果.....	62
5-3-4 分解性試験結果.....	63
5-4 結言.....	64
参考文献.....	64
第 6 章 ナノファイバーの形状記憶特性制御.....	65
6-1 緒言.....	65
6-2 実験方法.....	65
6-2-1 実験試薬.....	65
6-2-2 PCL-based polyurethane の合成方法と構造評価方法.....	66
6-2-3 電界紡糸法方法.....	66
6-2-4 DSC 測定方法.....	66
6-2-5 熱安定性試験方法.....	67
6-2-6 形状記憶性能評価方法.....	67
6-3 実験結果.....	67
6-3-1 PCL-based polyurethane の合成と構造評価.....	67
6-3-2 DSC 測定結果.....	69
6-3-3 熱安定性評価.....	69
6-3-4 形状記憶性能評価.....	70
6-4 結言.....	71
第 7 章 結言.....	71
発表リスト.....	73
謝辞.....	79

第1章 緒言

1-1 今日の医薬品開発の現状

世界のがん患者死亡者数は820万人に上っており(2012年)¹、治療薬が開発されていない希少がんも存在していることを考慮すると^{2,3}、新しい医薬品・治療法の開発は未だ必要とされている。しかしながら、開発コストの上昇、容易に作製できる安全で安定な候補化合物はすでに開発されてしまったこと、新薬創出から商品化まで約20年かかること、候補化合物から商品化できる新薬が非常に少ないこと、などの現状により、新規医薬品開発が難航している。Figure 1-1のモデルでは、候補化合物が次の開発のステップに進めることが可能な化合物の割合を示している。最終的に新薬開発にかかると予測される期間は14年で、候補化合物が最終的に商品化されるものは僅か4%であるとされている⁴。

今日の技術では新たにバイオ医薬品が開発可能となったが、低分子化合物と比較して精製や滅菌、評価方法が複雑であるために生産や管理にコストがかかるなど未だ医薬品開発の問題は山積している⁵。このような現代の社会的背景からもたらされる課題の解決に加えて、薬剤の副作用軽減や薬効の向上も待望されている。そこで、これらの解決策として、ドラッグデリバリーシステム(Drug delivery system; DDS)やドラッグ・リポジショニング(Drug repositioning; DR)の概念は、薬効の改善の他に、今まで認可が断念されてきた薬剤の薬効の改善や適用の拡大につながることを期待されている。

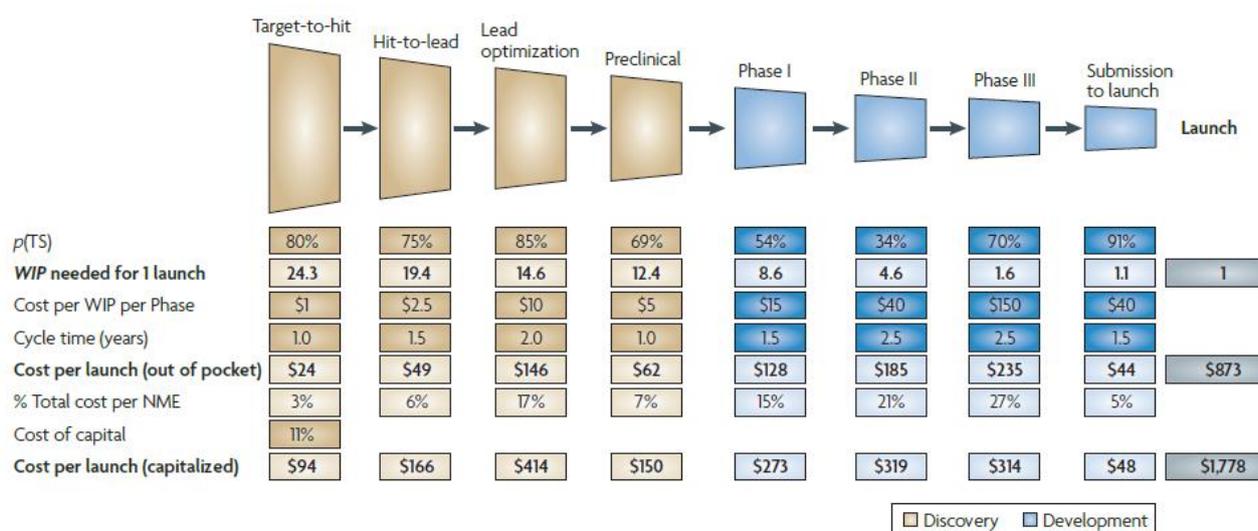


Figure 1-1. 候補化合物が商品化されるまでにかかるコスト、期間、割合をステップ毎に示したグラフ⁴

1-2 Drug Repositioning(DR)とは

DRとは、既知薬を別の疾患治療薬として応用する方法である⁶。既知薬の薬効や動態のデータが存在するため、開発期間の短縮やコスト削減が可能となり、製薬企業では積極的に取り入れられている方法である。DRは大きく分けて二種類の方法がある。

(1) 既存薬から未知の標的分子・作用機序の発見と新規効能の発見

通常、薬はオフ・ターゲット効果と呼ばれる、主とする標的分子以外の標的にも数多く作用する。これは副作用の要因ともなるが、場合によってはある一部の疾患に対して有効となる。例えば、胎児の催奇形性のために発売中止となった睡眠導入剤のサリドマイドは、血管新生抑制作用を示す事が明らかにされた。この

作用は胎児に対しては手足の毛細血管の成長を妨げ、奇形を発生させる原因となるが、癌の血管新生をも抑制することから、現在多発性骨髄腫の治療薬として臨床の場で用いられている。

(2) 既存薬の既知の標的分子・作用機序からの新規効能の発見

既存薬の主標的分子・作用機序を応用した、新規効能への応用も考えられている。生体内の機能分子や生物反応経路は、1つの疾患だけでなく多くの疾患に関与している。そのため、ある作用機序を有する既存薬が、これまで想定できなかった疾患や病態に適応することが可能になることが期待され、疾患や薬剤の作用メカニズムの研究が行われている。

これまでに、DRによって新規効能を獲得した医薬品には、臨床試験中のセレンディピティ（偶然発見されたもの）によるものが多く知られている。シルденаフィル（バイアグラ）の効能である勃起促進効果は、狭心症治療薬として開発中のフェーズ I 試験で偶然発見されたものであった。また、サリドマイドの別効能であるらい性結節性紅斑に対する効果や、プレリキサフォルの血液幹細胞への効果は、いずれもセレンディピティによるものである。代表的な分子標的剤であるイマチニブも慢性骨髄腫患者における臨床的知見に基づいて慢性関節リウマチへの効能拡大が図られているが、最近では、セレンディピティに依らない科学的根拠に基づく DR が主流となっている。疾患の病因解明やシステム生物学の進展と共に、ハイコンテンツセルスクリーニング法や多彩な *in vivo* スクリーニングなどの創薬基盤技術の開発や、疾患-標的-薬剤を結びつけるデータベースの整備と *in silico* とのドッキングなど、DRにおける体系的アプローチが可能となってきた。抗菌剤セフトリアキソンの筋萎縮性側索硬化症（ALS）への効能拡大、HIV 治療薬ネルフィナビルのがん治療薬としての可能性、抗うつ剤デュロキセチンの腹圧性尿失禁や抗うつ剤ミルナシプランの線維筋痛症への展開も、DR を期待した薬剤スクリーニングや薬理学的プロファイルと疾患との関連解析からもたらされたものである。

1-3 Drug Delivery System(DDS)とは

DDS とは、体内の薬剤の分布や量を、時間的・空間的に制御する技術全般ことで、薬効の増強や副作用の軽減が期待できる。1950 年にはすでに DDS の研究が始まり、今現在リポソーム医薬品はその効果が認められ、2017 年の時点で 18 品目が世界で上市され⁶、様々な形体のドラッグデリバリーシステムが開発されている。

最初に薬物輸送を試みたと考えられる研究は、1966 年 Folkman 等が、麻酔薬(エーテル、亜酸化窒素、ヘロタン、シクロプロパン)がシリコンゴムチューブ中を拡散することを利用し、静脈に挿入することで麻酔薬投与を試みたことである⁷。遠隔麻酔は、酸素と麻酔が肺を介して一緒に投与されなければならない、この方法で火傷患者や小児治療により効果的に麻酔を行えると提案した。血液中への連続的な麻酔拡散により、犬の短時間の麻酔を可能にしたが、手術を行うのに十分な麻酔を施行するにはいたらなかった。

また、薬物輸送を安定に行うために提唱された重要な研究として、ポリマー-ドラッグコンジュゲートが行われた。最初の報告では polyethylene glycol (PEG) と薬物を用いて行われ、これは PEGylation という言葉で知られている。1960 年代、Frank Davis が開発中の組換えタンパク質薬物の循環時間および安定性（酵素攻撃または免疫原性認識に対する）の両方を高める PEG 化の概念を示した⁸。これは、1980 年代の初めに、Enzon と呼ばれる会社の創設につながった。最初の臨床製品は、白血病癌細胞の必須栄養素であるアスパラギンおよびグルタミンを代謝するアスパラギナーゼおよびグルタミナーゼなどの PEG 化酵素であった。アラバマ大学の化学教授であるミルトン・ハリス (Milton Harris) は、後に大手製薬会社と協力し

て多数の PEG 化組換えタンパク質製品を診療所に導入するために、新たに Shearwater Polymers 社を設立した。Frank Davis の発表した論文⁹では、PEG-1900-カタラーゼおよび PEG-5000-カタラーゼは、反復静脈内注射の際に、無触媒血症マウスの血液の中で循環寿命を増強した。修飾酵素の注射に対する免疫応答の証拠は見られなかった。PEG-5000-カタラーゼで繰り返し注射されたマウスは、未修飾カタラーゼに対して免疫能が維持され、組織または器官損傷の証拠は見られなかった。

また、DDS 研究をより加速させた研究として、1984 年に熊本大学の前田博士が「浸透性と保持力の向上 ; EPR」を発見した¹⁰⁻¹¹。"SMANCS"と呼ばれた抗癌ペプチド薬であるネオカルシノスタチン (NCS) にコンジュゲートされたスチレン・無水マレイン酸 (SMA) を用いて動物実験を行い、腫瘍組織内に染色した薬剤が蓄積していることを発見し、固形腫瘍において急速に形成されている脈管構造が「漏出性」であると結論づけた。これは選択的に薬物輸送を行う DDS 研究において非常に重要な概念である。

1-4 全身化学療法と局所化学療法

新薬開発において副作用が課題であるということを述べたが、EPR の発見により、より選択的にがん組織に薬物輸送が可能となった。これは、局所に薬物輸送が可能になったということでもある。今日のがん治療において、全身化学療法は一般的に使用される治療戦略である。全身化学療法は、転移癌患者の治療に有効であるが、標的部位に薬物送達をすることに対しては効率的ではない。さらに、化学療法は血液循環系に沿って組織へ薬物が輸送され、また固形腫瘍内の間質腔の障壁も含んでいるため、投与された容量の一部しか標的部位には到達しない¹²。結果として、治療有効性が制限され、健康組織に対する毒性が生じる。一方で、局所化学療法は、標的部位での有効薬物濃度を維持しながら、全身薬物濃度を低いレベルで維持可能である。固形腫瘍は全てのがんの 85% を占めているため、この局所化学療法は、より効果的な治療戦略となりうる¹²⁻¹³(Figure 1-2)。様々な局所化学療法のための投与形態が報告されている。局所化学療法は、腫瘍部位内または腫瘍部位に近接した移植または注入のことを示す。全身の薬物暴露を減少させる標的部位での薬物滞留は、最小の毒性でかつ最大の薬効を達成できる。実際の局所化学療法が使用されている例として、膀胱腫瘍への治療があり、術後の腫瘍再発率低下と関連していることが調査されている¹⁴。また、非進行性非小細胞肺癌の場合や、腹腔内注入による卵巣がん治療の場合などにおいて、効果が発揮されていることが示されている¹⁵。これは、標的部位に、薬物を保持可能な生体材料を使用することでも実現可能である。例えば、ポリマーは移植材料、ペースト、ゲル、マイクロ粒子、ナノ粒子など様々なシステムの開発が可能であり、DDS キャリアとして広く研究されている¹⁶⁻¹⁷。高分子を使用した DDS キャリアの設計は広大であるが、これらを移植材料として使用する際の重要課題は、生体適合性および生分解性である¹⁸。高分子材料によって誘発される免疫応答は悪影響をもたらし、時には薬物放出特性にも影響する¹⁹。急性炎症反応は、マクロファージ、異物巨細胞、および線維芽細胞の活性時に生じ、その結果、DDS 担体の線推性被包が生じる¹⁸⁻¹⁹。この被包は異物に対する正常な組織応答であり、必ずしも石灰化や壊死のような生体適合性の欠如をしめすものではない¹⁹。さらに、ポリマーの分解産物の考慮も必要であり、これらは免疫応答または毒性応答を誘発する可能性がある。移植した薬物輸送材料を、治療後に外科的除去することは、患者のコンプライアンスを低下させるため、生分解も重要な性質である。生分解には、物理化学的要因(イオン交換、イオン強度、pH)、物理的要因(形状、大きさ、多孔性)、材料形態、微細構造の要素に加え、分解が酵素的か加水分解を経由して生じるなど、様々な要因が存在する²⁰。そのため、適切な生分解性が確保される薬物送達システムの設計は非常に重要である。

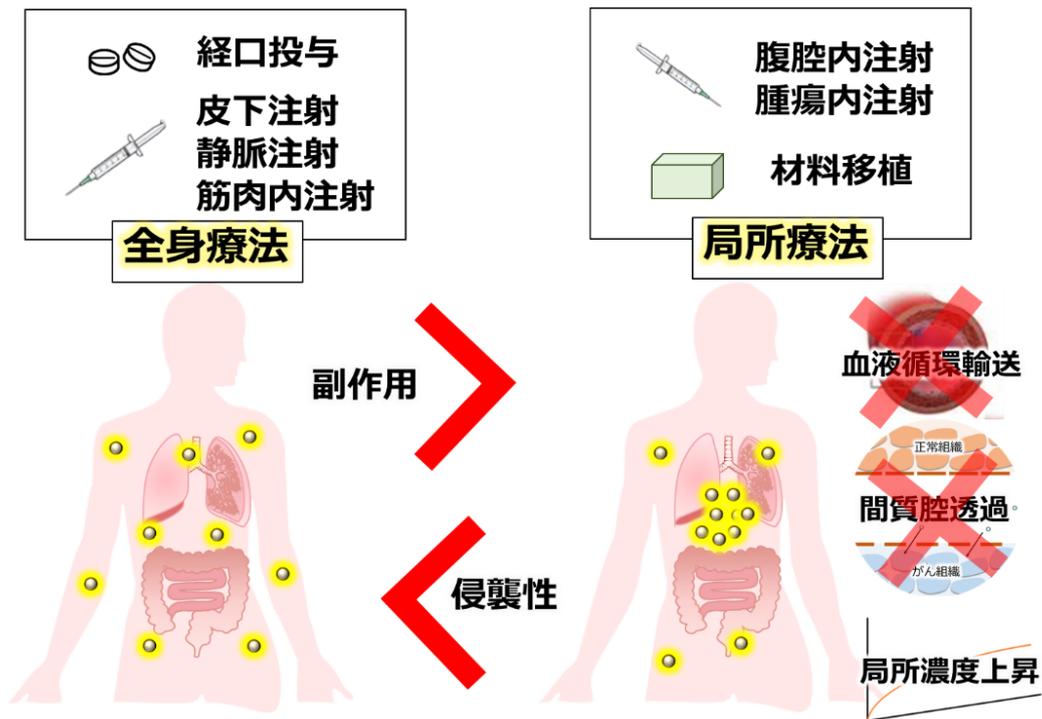


Figure 1-2. 全身化学療法と局所化学療法の特徴

1-5 局所薬物徐放と dose-dense therapy による薬効向上

化学療法は一般的に経口投与や静脈注射で行われるが、薬物が作用する有効濃度を保持させるためには、定期的に薬物投与が必要となる。しかしながら、DDSキャリアを用いて徐放させることにより、一度のDDSキャリアの投与で、薬物の有効濃度を長時間保持させることが可能となる。局所移植材料は薬物徐放と組み合わせることで、局所で一定の薬物濃度を長時間保持させて効能を低副作用で持続させることが期待できる。

薬物徐放とは別のDDS材料を用いない化学療法の効果を向上させる手法として、Dose-dense therapyという方法が使用されている。乳がんのみならず固形癌での腫瘍増殖速度は一定ではなく、腫瘍径が小さいものほど速く、腫瘍径が大きいものほど遅い傾向がある(Gompertzian model, Figure 1-3(a))。化学療法は細胞増殖が活発なものほど感受性が増すため、腫瘍径が小さく増殖の速い時期には、化学療法が良く効く。すなわち、1回の化学療法によって腫瘍量が減少すると、腫瘍増殖速度が増すが、化学療法への感受性も増すことになり、次回の化学療法で更なる腫瘍量減少が望める(Figure 1-3(b,c))。抗癌剤の抗腫瘍効果は単位時間当たりの抗癌剤の投与量(dose-intensity)に存している。Dose intensity を高めるには、1回の投与量を増加させる方法(dose-escalation)、投与間隔を狭める方法(dose-dense)があるが、dose-escalation によるdose-intensity の増加では、予後の改善は得られない。これより、少量の薬剤投与でも投与頻度を増加させることが可能であり、副作用を低減しつつ腫瘍縮退効果が望める。

これら二つの薬物投与の方法は、一見異なるように思えるが、dose-dense therapyの投与頻度を究極的に増加させた場合、それは絶え間なく少量ずつ薬物投与を行っている徐放と考えられる(Figure 1-4(d))。本研究においては、徐放の効果をdose-dense therapyとして評価・考察を行っている。

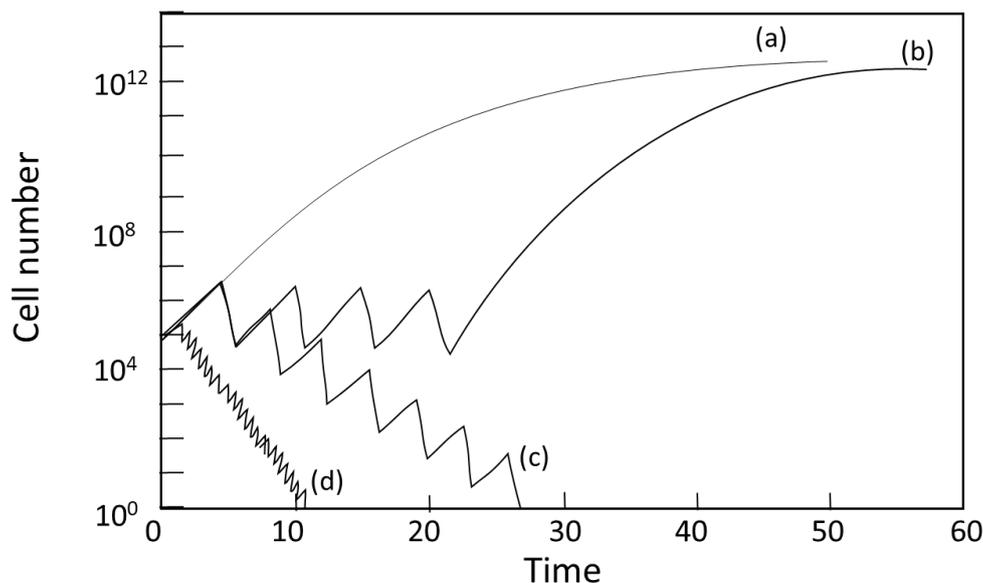


Figure 1-3.dose-dense therapy適用時の、Gompertzian modelによるがん成長を示したグラフ。

(a)治療なしの場合のがんの成長(control)

(b)通常の抗がん剤治療を受け、完全に根治する前に治療を終了した場合、がんは成長し最終的には(a)と同等の成長をする

(c)dose-dense therapy成功時のグラフ。抗がん剤投与後、がんの成長が阻害されているときに次の投与を行うことで、がんを効果的に阻害し続けることが可能となる。この場合、投与頻度が重要である。

(d) 抗がん剤を徐放させ続けた場合のがん成長を示したグラフ。常に低濃度で投与頻度を極限にまで高めた薬剤投与と考えられるため、効果的ながん成長を阻害できる。

1-6 温熱療法による薬効の向上

さらに薬効を向上させる方法として、温熱療法と併用することが知られている。温熱療法は、1時間患部または全身を40~45℃に温熱してがんを治療する方法である²¹。もっとも古いとされる温度を利用した治療については、紀元前3000年のEdwin Smithの手術のパピルスに記載されていた。Edwinは、頭部の傷や乳がんに対して温度を用いて治療した²²⁻²³。温熱療法の研究は19世紀にスタートし、その後20世紀まで発熱が温度を上昇させるために使用されていた一方で、周波数技術を利用する研究も始まった。世界的に温熱療法が注目され始めたのは、1975年にワシントンで初めて開催されたinternational congress on hyperthermic oncologyがきっかけである。最初の10年は、温熱に関する論文数と患者数が指数関数的に増加したが、スポンサーの熱意と病院の理事間の抵抗と、失望させる臨床結果によりその興味は衰えた。今日、温熱療法による治療結果の向上が十分であることを示す数々の研究により、温熱療法への興味は再び高まり、臨床応用する方法が開発されてきた²³。これまでに温熱療法は、腫瘍組織選択的に効果があることが報告されてきた。低酸素細胞に対して効果的に殺傷することや、温度上昇時に血流増加による熱回避機構が働かないこと、また温熱が免疫を活性化するということが報告されており、腫瘍選択的に効果があることが知られている²⁴⁻²⁵。

しかしながら実際の臨床においては温熱単独での顕著な効果は未だ得られておらず、寧ろ他の治療法との併用の容易さと、併用時の治療効果増強が顕著であることから、がん三大療法(外科手術、放射線療法、化学療法)と併用されることが多い。特に化学療法においては、併用した薬剤の細胞吸収の向上、腫瘍内薬物滞留性の向上、DNA修復阻害などによる温熱効果により、薬効が向上すると考えられている²⁶。様々な温熱と併用可能な薬剤をtable 1-1に示す。薬物耐性を相殺する化学療法と温熱療法の付加的効果として、マイトマイシンC、ニトロセルロース、シスプラチン、ドキシソルビシン、ミトキサントロンが示されている。複合的な効果のメカニズムは、増加した細胞内薬物吸収、DNA損傷、高い腫瘍内薬物濃度で、これらは血流の増加によ

って得られる。また複合的効果は、アルキル化剤、ニトロセルロース、白金抗がん剤を40℃以上で温熱された全ての細胞腫の場合で観察され、増加比は温熱温度と暴露時間に依存していた。これらの薬物の効果向上は1.2-10倍を示したが、最も高いものは23倍を示し、これは44℃で細胞に対してメルファランを投与したin vitroで観察された。アントラサイクリンとの併用では、結果は不一致で成長状態や薬物スケジュール、細胞腫毎に様々であった。In vivoの結果は、温熱療法がドキソルビシンやマイトキサントロンと併用した時に改善が見られた。代謝拮抗剤ビンブラスチン、ビンクリスチン、エトポシドでは、多くの研究では複合効果を示さなかった。エトポシドにおいては、毒性は減少したが、これは温度上昇による薬物の不安定化によると説明された。また、最近のin vivo研究は、多くの化学療法剤の細胞傷害性の熱強化が40.5℃～43.0℃の温度で最大化されることを実証している。

Table 1-1 抗がん剤と熱による相互作用の一覧²⁶

Class of agent		Interaction	Remarks
Platinum drug	Cisplatin	More than additive	Gradual increase with increasing temperature; highest when simultaneous
Alkylating agents	Carboplatin	More than additive	Gradual increase with increasing temperature; highest when simultaneous
	Cyclophosphamide		
	Ifosfamide		
Nitrosources	Melphalan	More than additive	Highest when simultaneous
	Mitomycin		
	Carmustine (BCNU)		
Antibiotics	Lomustine (CCNU)	Complex	Less than additive when heat precedes drug
	Bleomycin		
Pyrimidine antagonists	Doxorubicin	Independent	No interaction
	Actinomycin D		
Vinca alkaloids	5-Fluorouracil (5-FU)	Independent	No interaction
	Cytarabine (Ara C)		
Taxanes	Vincristin	Independent	No interaction
	Vinblastin		
Nucleosidanalogs	Paclitaxel	Complex	Cell type dependent; temperature 41.5-43.0 °C
	Gemcitabine	Additive	Only if applied 24 h before or after heat

Derived and adapted from Kampinga.¹⁰²

相乗作用は、細胞が薬物によって殺される速度の上昇する温度の連続変化として観察される。37℃から40℃以上に温度を上昇させると、ほとんどのアルキル化剤（例えば、シクロホスファミドおよびイホスファミド）および白金化合物ならびにニトロソウレア（BCNU および CCNU）が細胞傷害作用において直線的に増強されることが一般に認められている。対照的に、例えばドキソルビシンまたはブレオマイシンの場合、42.5℃またはそれに近い熱との相互作用のための閾値温度が存在するが、大部分の代謝拮抗物質（例えば5-フルオロデオキシウリジンおよびメトトレキサート）およびビンカアルカロイドまたはタキサンは独立した作用を示す。

併用のための機構には、アルキル化の速度定数の増加、薬物取り込みの増加、および薬物誘発致死または致死的損傷の修復の障害が含まれる。薬物熱系列に関する研究は、一般に、温熱療法直前に投与された薬物が最も有効であることを示している。しかし、代謝拮抗剤ゲムシタビンのような例外があり、インビトロおよびインビボで相乗効果を得るために薬物適用と熱との間の24時間の時間間隔が必要である^{27 28}。

また、温熱と併用する有用なDDSキャリアの研究が数多く行われ、リポソーム、タンパク質またはポリマーから作製されたキャリアは、様々な薬剤を腫瘍に輸送するために使用されている。温度応答性タンパク質またはポリマーの場合、例えば分子は37℃で親水性の状態にあるが、相転移温度を上回ると疎水性になり、高体温にさらされた組織内で凝集する。腫瘍自体への有効性を増強し、健かつ康な組織における副作用を最小限に抑えるために、加熱された腫瘍組織中のナノ粒子の治療関連因子の取り込みは、温熱を利用した新薬送達のための重要な分野である。

1-8 臨床における治療法の選択

実際に化学療法が適用されている割合を、Figure 1-3(a)に示す²⁹。このアンケート結果では、化学療法が80.5%(抗がん剤・ホルモン療法・分子標的治療)と一番多く、次いで外科手術(内視鏡・胸腔鏡・腹腔鏡)が71.5%、放射線療法が32.3%であった。このグラフからは、患者が一人あたり約二つの治療方法を受けていることと、手術・化学療法を適用される患者数が非常に多いことが分かる。例として、実際に肺癌と診断されたときの患者のステージ別の診断数と、そのステージにおける治療方法の適用をFigure 1-4に示した³⁰⁻³¹。このグラフも同様に、手術と特に化学療法の適用となる患者数の割合が非常に多いことが分かる。これより、薬効の改善を目指すほか、1-5で示したような手術と併用できる局所薬物徐放用移植材料は、実際に適用される患者の割合が非常に多いといえる。実際に、臨床に応用されている術後に使用される薬物徐放材料として、Gliadel® waferという材料が存在する³²。これはカルムスチンという脳腫瘍用抗がん剤が内包されているが、毒性を低減し、かつ用量を増加させる目的のために徐放材料として開発された。適用方法は、手術で脳腫瘍を全摘出した後に、摘出部に移植する。治療効果向上のため、複数の治療法との組み合わせが可能な材料は、適用される疾患や患者の幅を広げ、新たな治療方法を提供すると考えられる。

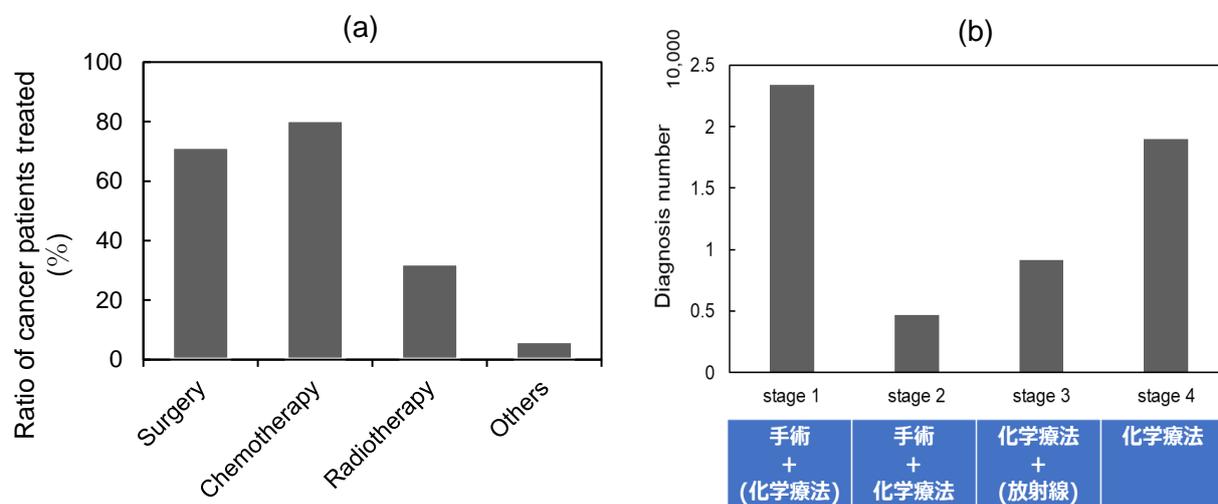


Figure 1-4. (a)治療を受けたがん患者に適用された治療の割合(b)肺癌患者のがん診断時のステージ別患者数

30-31

1-9 本論文における主題と構成

前項まで、新薬開発の争点となる副作用の軽減や薬効の改善のための方法(DDS, 局所徐放、dose-dense therapy, 温熱治療との併用)について記述した。実際にはこれらの方法は単独では様々な材料や薬剤を用いて多くの研究がなされている。より効果的に薬効を改善するには、これらを組み合わせることが可能な、新規材料設計を行う必要がある。様々な薬剤の効能の向上や治療適用範囲拡大の目的のため、これまでほとんど開発が進んで来なかった埋め込み型の局所 DDS 基材の開発を本研究の主題とした。ユニークな特性を有するスマートポリマーからなるナノファイバーに注目し、疾病の程度にあわせた様々な薬物放出パターンの実現をめざした。これにより患部局所で適切な薬物治療が可能となるため、治療効果の劇的な向上が期待できる。第2章では、薬物長期徐放を目指したナノファイバーの設計と抗腫瘍効果について述べる。第3章では、さらなる薬効の上昇をめざし、温熱と薬物徐放の併用を可能にする発熱型ナノファイバー開発を行った。第4章では、薬物の ON-OFF 放出制御の実現をめざし、温度応答性スマートポリマーからなるナノファイバーメッシュの設計について述べる。最後に、これらのナノファイバーの実用化を考えた際に生じる種々の課題に対して、第5章ではナノファイバーの生分解性、第6章ではナノファイバーの移植に際する形

状特性についての検討を行った。これらの研究を通して、薬剤そのものだけでは解決が難しかった全身副作用の回避や長期薬効の維持、さらには臨床で行われている集学的治療のための他治療法との併用など、種々の課題に対して材料開発という立場から一つの突破口の糸口となることを期待する(Figure 1-5)。

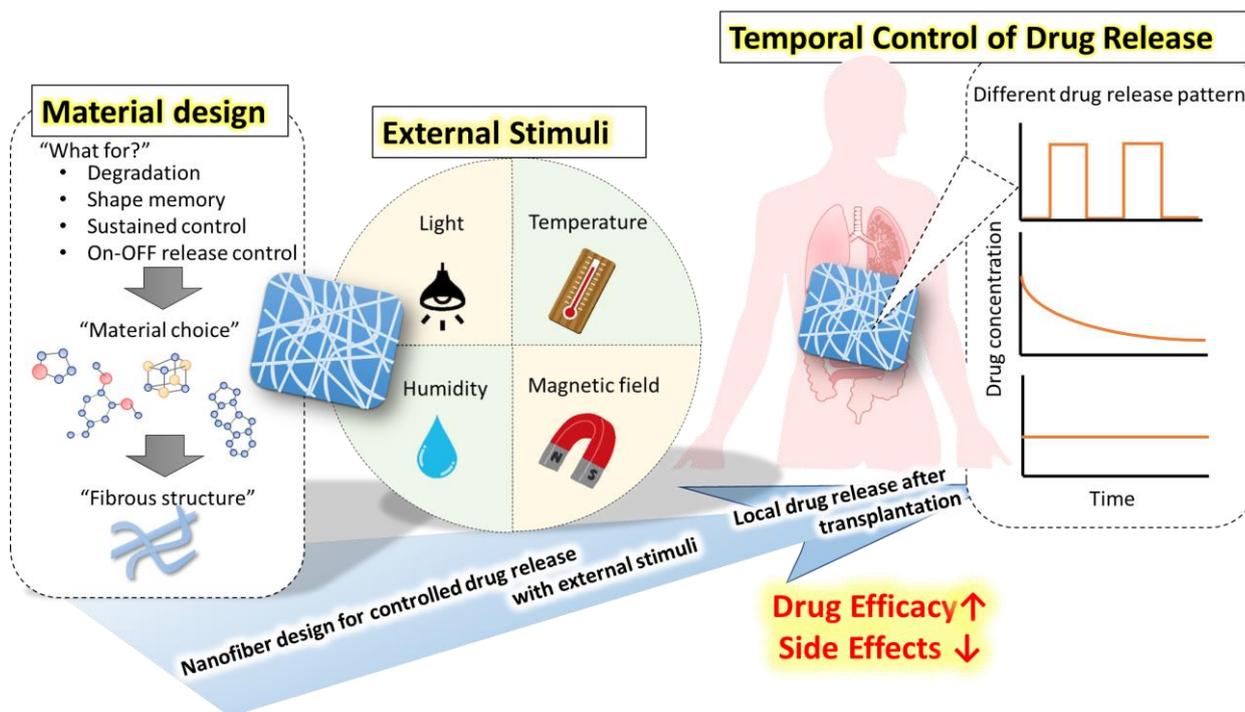


Figure 1-5. 本論文で目的とする DDS 材料の設計

参考文献

1. Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A., Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **2015**, *65* (2), 87-108.
2. Rubinstein, Y. R.; Groft, S. C.; Bartek, R.; Brown, K.; Christensen, R. A.; Collier, E.; Farber, A.; Farmer, J.; Ferguson, J. H.; Forrest, C. B.; Lockhart, N. C.; McCurdy, K. R.; Moore, H.; Pollen, G. B.; Richesson, R.; Miller, V. R.; Hull, S.; Vaught, J., Creating a global rare disease patient registry linked to a rare diseases biorepository database: Rare Disease-HUB (RD-HUB). *Contemp Clin Trials* **2010**, *31* (5), 394-404.
3. Abbott, A., Rare-disease project has global ambitions *nature* **2011**, *472*, 17.
4. Paul, S. M.; Mytelka, D. S.; Dunwiddie, C. T.; Persinger, C. C.; Munos, B. H.; Lindborg, S. R.; Schacht, A. L., How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9* (3), 203-14.

5. 水島徹, 創薬が危ない. *ブルーバックス* **56-59**.
6. 菊池寛, 薬剤の太刀人による薬剤技術の伝承 第3巻. 313-333.
7. Folkman, J.; Long, D. M.; Rosenbaum, R., Silicon Rubber_A new diffusion property useful for general anesthesia. *Science* **1966**, *154*, 148-149.
8. Davis, F. F., The origin of pegnology. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, *54*, 457-458.
9. Abuchowski, A.; MuCoy, J. R.; Palcxuk, N. C.; Es, T. V.; Davis, F. F., Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulatig life of bovine liver catalase. *the journal of biological chemistry* **1977**, *252*, 3382-3386.
10. Iwai, K.; Maeda, H.; Konno, T., Use of oily contrast medium for selective drug targenting to tumor_enhanced therapeutic effect and X-ray image. *Cncaer res* **1984**, *44*, 2115-2121.
11. H. Maeda, J. W., T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics_a review. *Journal of controlled release* **2000**, *65*.
12. Jang, S.; Wientjes, M.; Lu, D.; Au, J. L. S., Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharm Res.* **2003**, *20*.
13. Fung, L.; Saltzman, W., Polymeric implants for cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev.* **1997**, *26*, 209-30.
14. Wientjes, MG.; Badalament, RA.; Au, JL., Penetration of intracesical decorubicin in human bladders. *Cancer Chemother Pharmacol* **1996**, *37*, 539-546.
15. Alberts, DS.; Delforge, A, Maximizing the delivery of intraperitoneal therapy while minimizing drug toxicity and maintaining quality of life. *Semin Oncol* **2006**, *33*, 8-17.
16. Jagur-Grodzinski, J., Polymers for targeted and/or sustained drug delivery. *Polym Adv Technol.* **2009**, *20*, 595-606.
17. Kim, S.; Kim, J.; Jeon, O.; Kwon, I.; Park, K., Engineered polymers for advanced drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* **2009**, *67*, 676-81.
18. Park, H.; Park, K., Biocompatibility issues of implantable drug delivery systems. *Pharm Res.* **1996**, *13*, 1770-6.
19. Rihova, B., Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. *Adv Drug Deliv Rev* **1996**, *21*, 157-76.
20. Pillai, O.; Panchagnula, R., Polymers in drug delivery. *Curreopin Chem Biol* **2001**, *5*, 447-51.

21. P Wust, B.H., G Sreenivasa, B Rau, J Gellermann, H Riess, R Felix, and PM Schlag, hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet oncol* **2002**, *3*.
22. Van der Zee, J., Heating the patient: a promising approach? *Annals of Oncology* **2002**, *13*(8), 1173-1184.
23. Tisherman, S. A.; Rodriguez, A.; Safar, P., Therapeutic hypothermia in traumatology. *Surg. Clin. -North Am.* **1999**, *79*(6), 1269-+.
24. Westra, A.; Dewey, W. C., Variation in sensitivity to heat shock during cell-cycle of chinese hamster cells in-vitro. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics Chemistry and Medicine* **1971**, *19*(5), 467-&.
25. Chicheł, A.; Skowronek, J.; Kubaszewska, M.; Kanikowski, M., Hyperthermia – description of a method and a review of clinical applications. *Rep Pract Oncol Radiother* **2007**, *12*(5).
26. Issels, R. D., Hyperthermia adds to chemotherapy. **2008**.
27. Haveman, J.; Rietbroek, R. C.; Geerdink, A.; Vanrijn, J.; Bakker, P. J. M., effect of hyperthermia on the cytotoxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) in cultured sw1573 cells. *Int. J. Cancer* **1995**, *62*(5), 627-630.
28. Van Bree, C.; Beumer, C.; Rodermond, H. M.; Haveman, J.; Bakker, P. J. M., Effectiveness of 2',2' difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) combined with hyperthermia in rat R-1 rhabdomyosarcoma in vitro and in vivo. *International Journal of Hyperthermia* **1999**, *15*(6), 549-556.
29. 厚生労働省委託事業 平成 22 年度 がん対策評価・分析事業.
30. 国立研究開発法人 国立がん研究センター がん診療連携拠点病院等院内がん登録全国集計より抜粋.
31. 日本肺癌学会編「EBM の手法による肺がん診療ガイドライン 悪性胸膜中皮腫・胸腺腫瘍含む 2016 年度版」. 金原出版.
32. Westphal, M.; Ram, Z. ; Riddle, V. ; Hilt, D.; Bortey, E.; On behalf of the Executive Committee of the Gliadel Study Group, Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. *Acta Neurochir (Wien)* **2006**, *138*, 269-275

第 2 章 抗がん剤の長期徐放を実現するナノファイバーの設計

2-1 緒言

本章は、疎水性薬剤パクリタキセル(PTX)の長期徐放を目的としたナノファイバーの設計を行った。有機溶媒ベースの製剤は、その添加物が深刻な副作用を引き起こす原因となっている。そこで、このような有機溶剤を使用した疎水性薬剤を代表に、薬剤の副作用の解決および効能の改善を目指し、薬物徐放ナノファイバーメッシュの設計に至った。

2-1-1 Paclitaxel (PTX)

パクリタキセル(PTX)は、乳がん、肺癌、卵巣がんなど様々ながん治療に使用されるタキサン系抗がん剤であり、細胞周期の M2 期において微小管の脱重合を阻害することで作用する。PTX は水に対して難溶性であるため、Cremophor EL®(ポリオキシエチル化された非イオン性界面活性剤)とエタノールの 50 : 50 混合溶液に溶解した状態で、Taxol®として使用されている¹。また、同じくタキサン系抗がん剤であるドセタキセルも難水溶性であるため、ポリソルベート 80(Tween®80)とエタノールで希釈され、Taxotere®として使用されている¹。静脈注射する際にはこれら Taxol®と Taxotere®は生理食塩水でさらに 5-20 倍希釈されて使用されているが、溶解させるために使用される添加剤が重篤な副作用を引き起こすために、DDS キャリアを使用した方法が数多く研究開発されている。近年では、アルブミンと PTX を結合させた粒子 abraxane®が低副作用でかつ効果的に作用するとして、臨床応用が認可された。このような背景から、モデル薬物として PTX を使用した。

2-1-2 Poly(ϵ -caprolactone)(PCL)とは

PCL は、1930 年代初期の Carothers たちによって合成された最も初期のポリマーのひとつである²。微生物によって分解される可能性のある合成ポリマーを模索した結果、商業的に入手が可能となった³。PCL は様々なアニオン性、カチオン性、配位触媒を用いて、 ϵ -caprolactone の開環重合または 2-methylene-1,3-dioxepane のフリーラジカル重合で容易に作製可能である⁴。PCL は、疎水性の半結晶性ポリマーであり、その結晶化度は分子量の増加とともに減少する傾向がある。PCL の溶解性、低い融点($T_m = 59\sim 64^\circ\text{C}$)、優れたブレンド適合性は、生物医学分野における応用研究を加速させた^{5,7}。その結果、1970 年代～1980 年代の吸収性ポリマーブームの時に、PCL およびそのコポリマーは、多くの薬物送達系に使用された。さらにポリマーの疎水性、接着性、生体適合性を付与するためにも使用されてきた。PCL はポリグリコール酸(PGA)やポリ乳酸 (PDLA) などよりも遅い速度で分解し、最大 3～4 年分解にかかる。そのため、遅い速度で分解する DDS や縫合材料 (Maxon) などに使用されている。移植材料に必要な性能(生体適合性、生分解性)について 1-4 で説明した。本研究においては、局所移植したナノファイバーからの長期薬物徐放のため、また移植材料に必要な性能を有する材料として、PCL をファイバー材料として使用した。

2-2 実験方法

2-2-1 試薬

本章で使用した実験試薬および装置のリストを下記に示す。

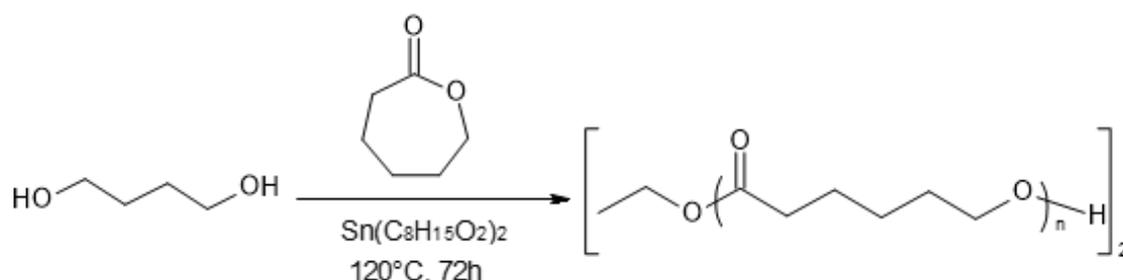
Table 2-1 2章で使用した試薬リスト.

Reagent	Abbreviations	Company	Location
ϵ -Caprolactone	CL	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Tetrahydrofuran	THF	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
1,4-butandiol	BD	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Tin (II) ethylhexanoate		Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
Methanol	MeOH	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Diethylether		Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol	HFIP	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PBS	nakalai tesque	Kyoto, Japan
Paclitaxel	PTX	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Butorphanol tartrate 5 mg/mL		Meiji Seika Pharma Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Medetomidine 1 mg/mL		Meiji Seika Pharma Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Midazolam 10 mg/2 mL		Sandoz Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Taxol®	TAX	Bristol-Myers Squibb Company	NY, USA
NCI-H23		American Type Culture Collection	Manassas, VA, USA
RPMI 1640 with L-In		Nacalai Tesque Inc.	Kyoto, Japan
5.0 g/L-trypsin/5.3mmol/L-EDTA solution		Nacalai Tesque Inc.	Kyoto, Japan
antibiotic-antimycotic mixed stock solution (X100)		Nacalai Tesque Inc.	Kyoto, Japan
Sodium pyruvate solution		Nacalai Tesque Inc.	Kyoto, Japan
MEM non-essential amino acids solution		Nacalai Tesque Inc.	Kyoto, Japan
Fetal bovine serum	FBS	Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
Female SCID mice		Charles River Laboratories Japan, Inc.	Yokohama, Japan
Chloroform-d (containing 0.05wt% TMS) 99.6atom%D (stabilized with Silver chip)		Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan

UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water		Thermo Fisher Scientific K.K	Tokyo, Japan
Alamar blue assay		TREK Diagnostics	Cleveland, OH, USA

2-2-2 Poly(ϵ -caprolactone)の合成

開環重合反応により polycaprolactone (PCL)の合成を行った。まず CL の精製を蒸留によって行った。12 時間真空乾燥した 1,4-butandiol (BD) 220 μ L (2.47 mmol) に窒素フロー下で ϵ -caprolactone (CL) 105 mL(0.99 mol)を加えてよく攪拌し、その後 Tin (II) 2-ethylhexanoate (0.5 mmol)を滴下した。反応溶液は 120°Cで72時間攪拌した。溶液を 55°Cの水浴中で攪拌しながら、溶液が完全に溶解するまで Tetrahydrofuran (THF)を 100 mL 加えた。溶液はヘキサンで 2 回再沈殿させることで精製した。NMR および GPC により、合成した PCL の構造および分子量を同定した。



Scheme 2-1. PCL の合成

2-2-3 電界紡糸法および構造評価の方法

2-2-2 で合成した PCL 900 mg と PTX 6.75 mg もしくは 13.5 mg を 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP) 4.5 mL に加え、室温で 12 時間超音波を照射しながら攪拌した。PTX 量は文献の動物実験に使用した量(24 mg/kg, 12 mg/kg)を参考にし⁸、移植するファイバーを 1 片 40 mg にカットした際の PTX 量が 0.6 mg もしくは 0.3 mg となるようにした。HFIP 溶液に PTX と PCL が完全に溶解していることを確認した後、PCL 溶液を 22G の針を装着した 5 mL シリンジに充填した。シリンジ内の気泡を抜いたのち、電界紡糸装置に溶液を充填したシリンジを設置した。コレクターにはアルミホイルを使用した。シリンジ-コレクター間距離を 13 cm に固定し、流量と電圧の条件を変えて電界紡糸を行った。各種電界紡糸条件で作製したファイバーの構造は、走査型電子顕微鏡(SEM)で構造観察を行った。

2-2-4 薬物放出試験方法

PTX 内包ナノファイバーを 40 mg 片にカットし、内包 PTX が 0.3 mg のナノファイバー(PTX 0.3_NF)とした。カットしたナノファイバーを、それぞれ 10 mL サンプル管中で 37°C下 PBS 5 mL 中に浸漬させた。一定期間毎に 2 mL の PBS をそれぞれのサンプル管から回収し、新たに 2 mL の PBS を加えた。回収したサンプル溶液の吸光度($\lambda=230$ nm)を測定し、下記の式からナノファイバーから放出された PTX 量を同定した。

$$\text{Cumulated released PTX (\%)} = (D_{\text{released}} / D_{\text{total}}) \times 100 \quad (1)$$

D_{released} はその期間までに放出された全 PTX 量を示し、 D_{total} はそのナノファイバーに内包された全 PTX 量を示す。検量線は PTX を溶解した MeOH : PBS = 7 : 3 の溶液から作製した。0.1 mg/mL の PTX を溶解した MeOH/PBS の混合溶液を貯蔵液として調製した。MeOH/PBS で 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍希釈した 0.05 mg/mL, 0.025 mg/mL, 0.0125 mg/mL, 0.00625 mg/mL の PTX 溶液を調製した。それぞれの溶液について吸光度を測定し、波長 $\lambda = 230 \text{ nm}$ の極大吸収波長のピークを記録し、下記の検量線を作製した。

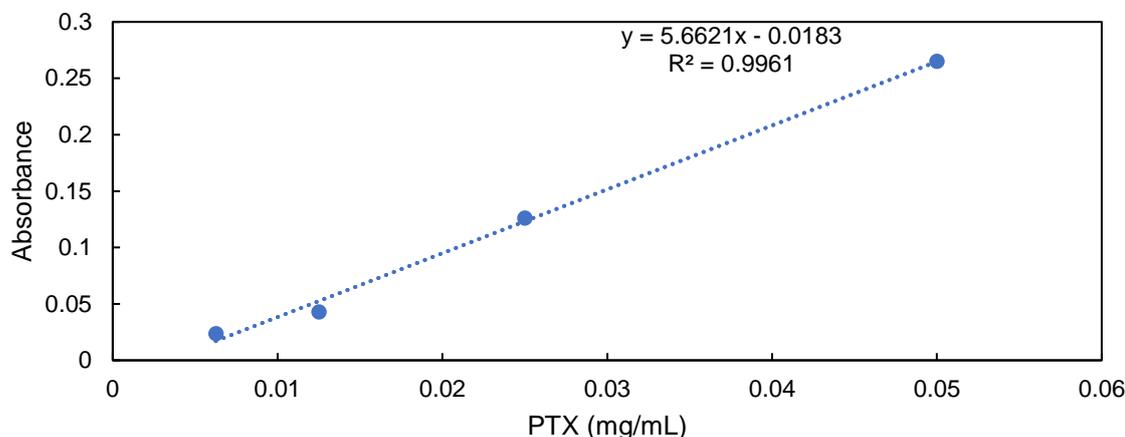


Figure 2-1. PTX の検量線

2-2-5 細胞実験方法

(1)細胞の培養と継代

まず細胞培養の培地を調製した。RPMI 1640 with L-In 500 mL、antibiotic-antimycotic mixed stock solution 5.5 mL、sodium pyruvate solution 5.5 mL、MEM non-essential amino acids solution 5.5 mL、fetal bovine serum 50 mL を 37°C の恒温槽で 30 分加温し、混合することで培地を得た。続いて凍結している NCI-H23(肺腺癌細胞)のクライオバイアルを解凍した。実験用手袋に入れ、37°C の恒温槽で湯浴して急速解凍した。半解凍の段階で湯浴から取出してクリーンベンチに移動し、37°C の培地 10 mL を加えた 100 mm Tissue Culture Dish (IWAKI) に添加した。CO₂ 5%、37°C のインキュベーター内に静置した。2 日後に細胞が 80% のコンフルエントであることを確認した後、継代を行った。培地を取り除いた後 PBS 10 mL を dish に添加して洗浄した。洗浄した PBS を取り除いた後、5.0 g/L-trypsin/5.3mmol/L-EDTA solution 3 mL を dish に加え、37°C、CO₂ 5% のインキュベーターに 3 分静置した。インキュベーターから取出した dish をタッピングし、顕微鏡で全て細胞が浮遊していることを確認した。クリーンベンチにおいた dish に 3 mL の培地を加えて trypsin と懸濁して中和させた。懸濁液を 15 mL 遠心チューブに回収し、dish に PBS を 5mL 加えて洗浄した。洗浄液も同様に遠心チューブに回収し、15000 rpm で 3 分間遠心した。上澄み溶液を除去し、沈降した細胞に培地 12 mL を加えてよく懸濁させた。新たに培地 1 mL を入れた 35 mm dish を 12 枚用意し、細胞を 1 mL (0.3×10^6 cells) 播種した。その後二日間培養し、(2)ファイバーの毒性試験を行った。

(2)ファイバーの毒性試験

2-2-3 で作製した NF(PTX なし)、PTX 0.3_NF を 3 サンプル用意した。24-well plate に入れて 48 時間 37°C でガス滅菌を行った。その後、培養した細胞 1 dish につきファイバーを一片入れ、一日インキュベートした。Dish 中のファイバーを取り除き、alamar blue を 200 μ L 添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。その後、alamar blue の蛍光強度を microplate reader (ARVO, Perkin Elmer Japan Co., Ltd., Kanagawa,

Japan) で測定した。得られた蛍光強度の Control の細胞生存率を 100% とし、それぞれのサンプルの生存率を計算した。

2-2-6 動物実験方法

(1)細胞培養

細胞を上記 2-2-5(1)の方法で継代したのち、225cm²細胞培養フラスコ 32 個(皮下担癌モデルマウス 1 匹の作製に必要な細胞数は 2×10^7 cell であり、 1×10^8 cell を注入することとした。225cm² フラスコ一個のコンフルエントの培養で約一匹分の注入量である)に細胞を播種した。約一週間培養し、動物実験当日に全ての培養細胞を、トリプシン処理をして回収した。用意した 1 mL チューブ 8 個に、約 4×10^8 cell ずつ入れた。チューブは常に氷を入れた発砲スチロールに差しておき、動物実験室までチューブを氷を入れた発砲スチロールで運んだ。

(2)3 種混合麻酔の作製

担癌モデルマウス作製にあたり、マウスを昏睡させるため 3 種混合麻酔を用いた。3 種混合麻酔は 50mL チューブに 2.5 mL の butorphanol tartrate 5mg/mL、750 μ L の medetomidine 5 mg/mL、2.0 mL の midazolam 5 mg/mL、7.25 mL の ultra pure distilled water を混合した。マウスの腹腔内に 1 匹あたり 100 μ L を注入した。注入後麻酔が効くまで約 30 分間時間を要した。

(3)担癌モデルマウスの作製

細胞が 4×10^8 cell 入っているチューブから 1 mL シリンジに細胞を全て充填し、全量(μ L)を確認した。その後、細胞をマトリジェルと混合した際に細胞数が 1×10^8 cells/mL となるよう、マトリジェルを混合した(ex. 細胞が 250 μ L だった場合、マトリジェルは 750 μ L)。マウス一匹当たり 250 μ L を皮下に注射した。これをマウス 30 匹分行った。その後腫瘍が 100mm³ となるまで約 30 日間マウスを飼育した。

(4)ファイバーの移植/PTX の皮下注射

NCI-H23 細胞を皮下注入してから 30 日後、皮下腫瘍部にファイバーを移植した。マウスの治療グループは、6 グループ(治療なし ; control、ファイバー : NF、0.3 mg PTX 内包ファイバー : PTX0.3_NF、0.6 mg PTX 内包ナノファイバー : PTX0.6_NF、0.3 mg PTX の皮下注射 : PTX0.3_s.c.、0.6 mg PTX の皮下注射 ; PTX0.6_s.c.)とし、5 匹ずつとした。皮下注射に使用した PTX は、市販されている Taxol[®]の 30 mg/5 mL を生理食塩水で希釈し、0.3 mg/800 μ L もしくは 0.6 mg/800 μ L とした。皮下注射は一週間に一度行い、0.3 mg/800 μ L を 100 μ L (37.5 μ g)、0.6 mg/800 μ L を 100 μ L (75 μ g) 注射した。注射時は皮下腫瘍の局所に注射し、ファイバーは切開し皮下腫瘍の上に移植した。全てのグループについて、実験開始前に切開して腫瘍サイズを計測し、縫合した。二カ月間の治療後、再び切開して腫瘍サイズを計測した。

2-3 実験結果

2-3-1 合成した PCL の構造評価

再沈殿で精製した後の PCL の構造について、CDCl₃ 中で ¹H-NMR スペクトル測定を行った(Figure 2-2)。

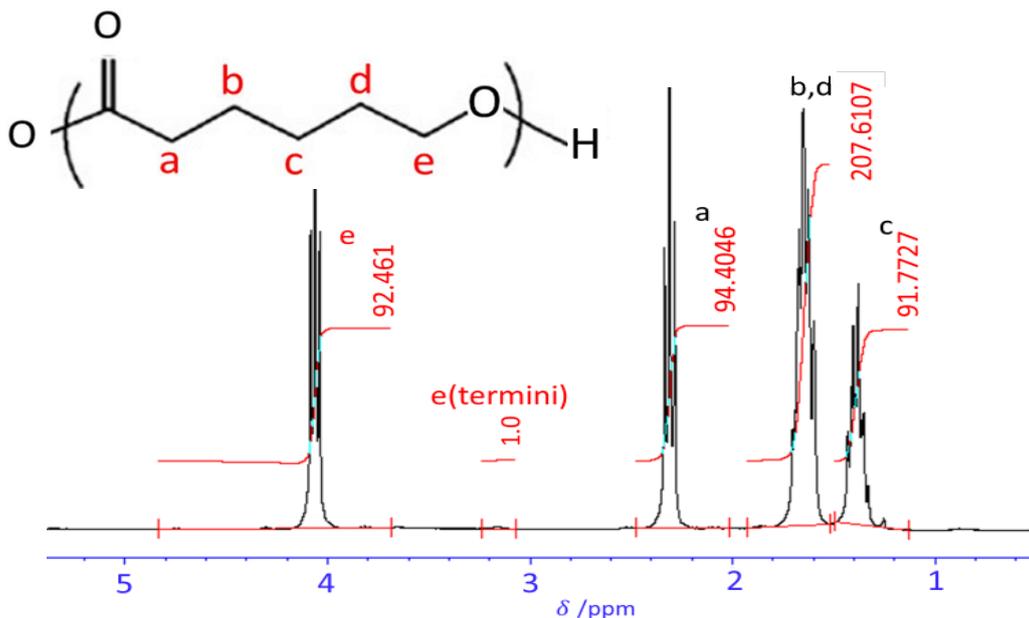


Figure 2-2. PCL の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

Figure 2-2.より、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルのピークと積分値の同定が可能であった。また、合成した PCL の分子量を GPC(THF)で測定した。結果を Table2-2 に示す。分子量が 58k の PCL の合成に成功した。分子量は電界紡糸するためには一定以上の値である必要があり(5 章で記述)、58k は電界紡糸するに適している。

Table 2-2 PCL の GPC 結果

Mn	Mw	Mw/Mn
58100	87151	1.50

2-3-2 ナノファイバーの構造評価

電界紡糸条件を 20kV, 流量 1.0 mL/h において、PCL 溶液濃度を 5-30 wt/v%の時のファイバー構造の評価を行った。結果を Figure 2-3 に示す。5 wt/v%ではビーズのみ観察され、ファイバーは一切構成されなかった。10wt/v%および 20wt/v%でナノファイバー構造が観察された。10wt/v%はよりファイバー径が小さく、20wt/v%ではややファイバー径が大きくなるがより均一なファイバーが作製された。30wt/v%ではマイクロファイバーが形成され、さらにファイバー構造とともに膜のような構造も観察された。おそらく PCL 濃度が高いために、一部のみしかファイバーが形成されなかったと考えられる。本章においては、20wt/v%の PCL 濃度で電圧 20kV, 流量 1.0 mL/h で紡糸したナノファイバーを用いて、次の薬物放出試験および抗腫瘍効果の評価を行った。

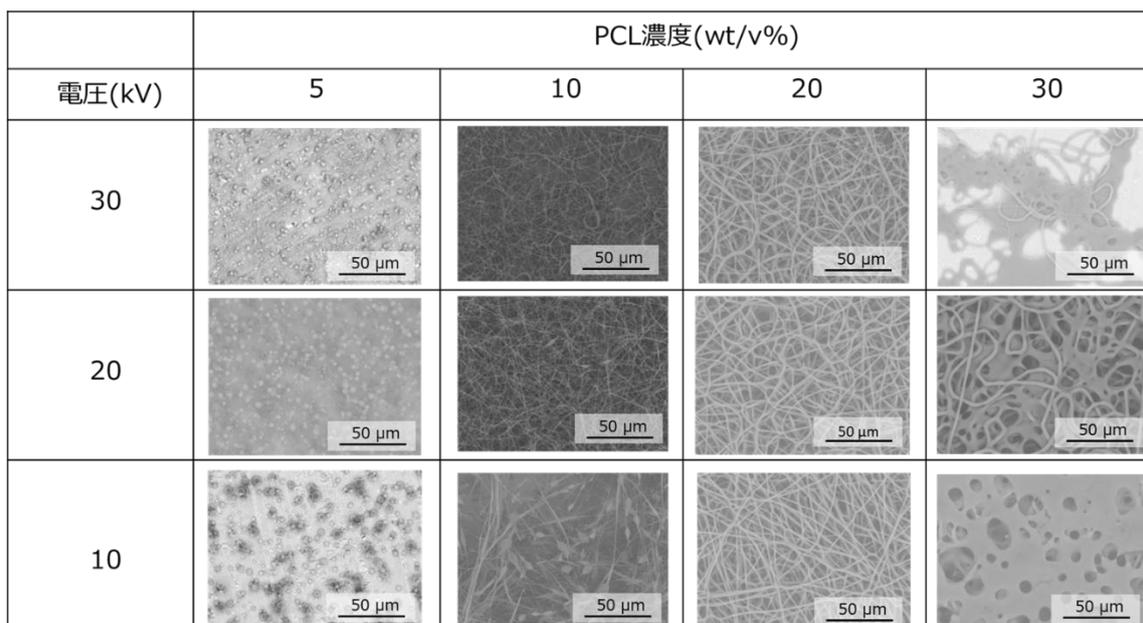


Figure 2-3. 流量 1.0 mL/h 時の PCL 溶液濃度 5-30 wt/v%、電圧 10-30 kV で電界紡糸した際の SEM 画像.

2-3-3 薬物放出試験結果

PTX0.3_NF を 5 mL の PBS に浸漬させ、一定時間ごとに回収した PBS 溶液中の PTX の放出量を測定した吸光度から算出した(Figure 2-4)。累積した PTX 放出量は、一か月以上にわたり徐放が可能であった。30 日目で放出量が全 PTX 内包量の 20%(60 $\mu\text{g/mL}$)に達し、一日あたりの平均薬物放出量は、約 2 μg であった。この放出量が細胞に対して効果が見られるか、事項の細胞実験で評価した。

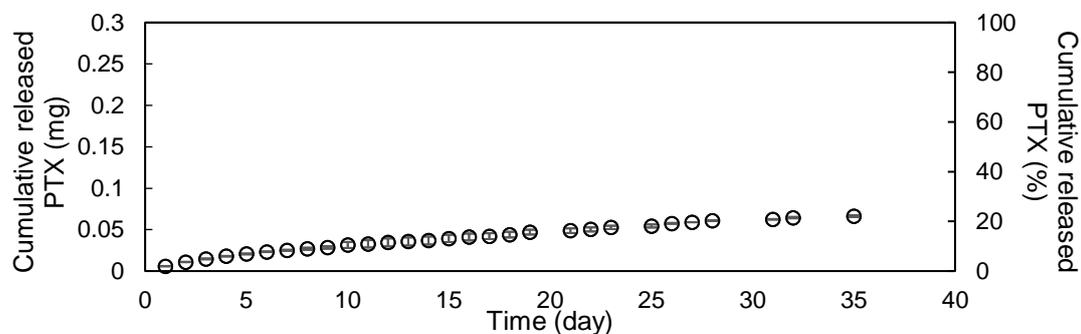


Figure 2-4. 37°C PBS における PTX0.3_NF の累積放出量

2-3-4 細胞実験結果

NCI-H23 細胞を 2-2-5 の手順で培養し、PTX0.3_NF の抗腫瘍効果を評価した。まず、IC₅₀ 値を調べるため、Taxol 溶液を PBS で希釈し、培地に添加した PTX 濃度がそれぞれ 0, 17, 33, 53, 80 $\mu\text{g/mL}$ (0, 20, 39, 62, 94 nM) となるよう、PTX 溶液を添加した。一日後の培養結果を Figure 2-5 に示す。PTX を添加していないものを control とし、この時の細胞数を 100% としてグラフ化した。また、作製した PTX0.3_NF および PTX を内包していない NF を細胞と一日共培養した際の、それぞれの細胞生存率を Figure 2-6 に示した。

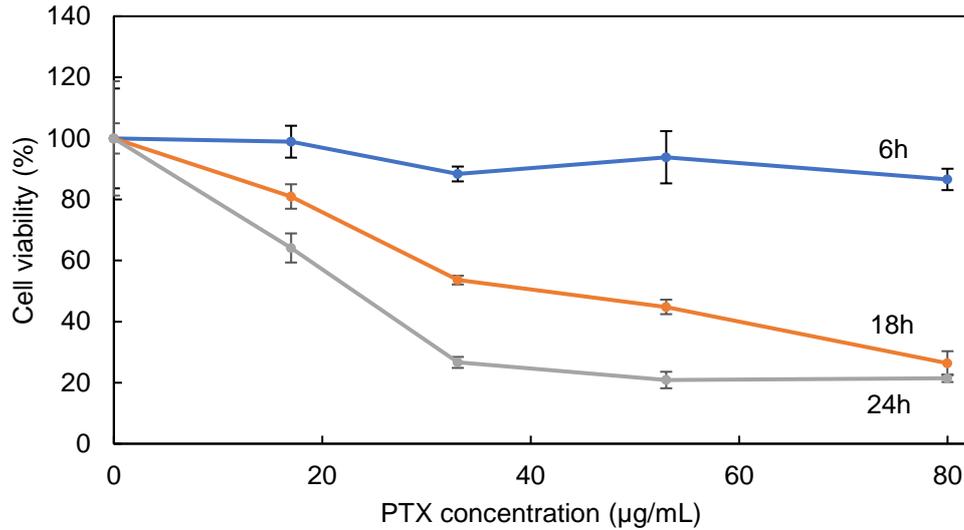


Figure 2-5. 0, 17, 33, 53, 80 µg/mL の PTX を NCI-H23 に添加し、6 時間,18 時間, 24 時間後の後の細胞生存率を示したグラフ

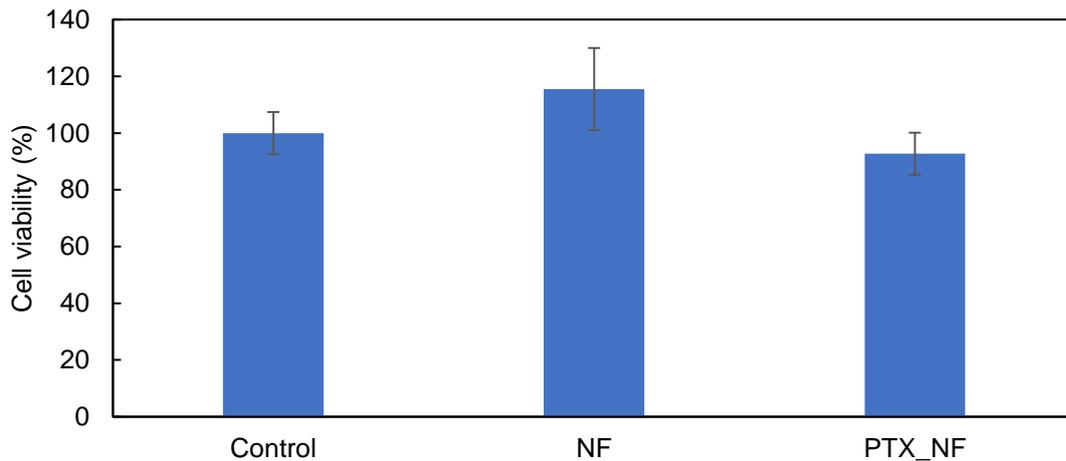


Figure 2-6. Control, NF, PTX0.3_NF の一日後の細胞生存率のグラフ

2-5 の結果より、細胞生存率が 50%(IC₅₀)となるのは、18 時間後に約 33 µg/mL (39 nM)、24 時間後に 25 µg/mL (30 nM)であることが分かる。PTX_NF による一日後の細胞生存率は、92%であった。2-3-3 の結果より、一日目に放出された PTX は 5.8µg であった。本実験で培養に使用した培地 3 mL では、一日後に培地中の PTX 濃度は 1.9 µg/mL (2.2 nM)となる。この濃度では、Figure2-5 の結果と照合すると一日目はほとんど細胞に対して毒性は示さないことは当然と考えられる。しかしながら、ナノファイバーから PTX は定期的放出されて累積 PTX 量は増加し、細胞はその間 PTX にずっと暴露され続けるため、殺傷効果が日数を追うごとに増加することは十分考えられる。実際に Figure 2-5 から、培養時間により IC₅₀値が異なることが分かる。過去に NCI-H23 を含めた各 NSCLC 細胞において、その IC₅₀ 値が時間によって異なることが報告されている⁹。この論文では、Taxol を細胞に添加後、MTT assay を異なる培養時間毎に行っており、Taxol 添加 3 時間後に 32 µM、24 時間後に 0.29 µM、120 時間後では 0.0099 µM の IC₅₀ 値を報告している。この論

文では 3 時間後と 24 時間後の IC₅₀ 値が 100 倍増加し、24 時間後と 120 時間後では約 3000 倍増加している。これほど劇的な IC₅₀ 値の変化は本実験では得られていないが、同じ傾向が見られている(6 時間後と 24 時間後の IC₅₀ 値は 1.3 倍異なる)。本実験で使用した PTX 溶液は、PBS による希釈率が大きいため、Taxol 溶液中の添加剤量がより減少したことが原因の一つと考えられる。これらの結果および知見により、ファイバーから放出される PTX が少量であっても、日数をかけることでがん細胞に作用可能であることおよび PTX は持続放出されて累積されることにより、十分効果が発揮されることが期待される。

2-3-5 動物実験結果

担癌モデルマウスを 2-2-6 の方法で準備し、ナノファイバーによる PTX 徐放効果について検討した。治療期間は二カ月とし、0.3mg および 0.6 mg の PTX を内包したナノファイバーを用意した。また、毎週局所注射する群を用意し、毎週 37.5 μg を皮下注射し二カ月間で合計 0.3 mg を投与する PTX0.3_SC, 毎週 73μg を皮下注射し二カ月間で合計 0.6 mg を投与する PTX0.6_SC とした。治療開始二カ月前後の腫瘍サイズ変化を Figure 2-7 に示す。

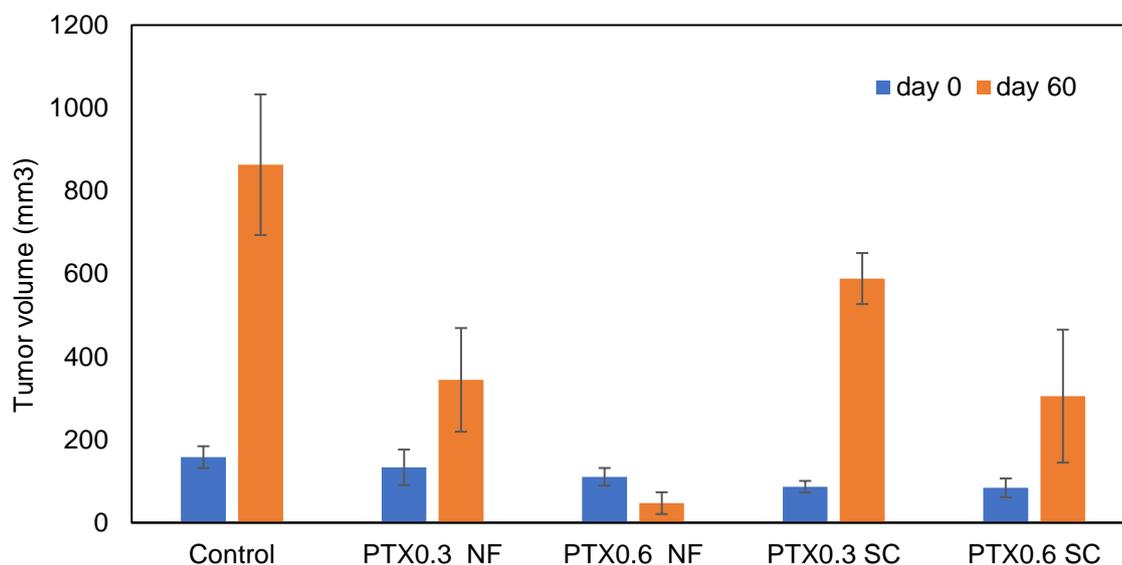


Figure 2-7. 実験開始前後での腫瘍サイズの変化を表したグラフ(Control: 治療なし、PTX0.3_NF: PTX 0.3 mg 内包ナノファイバー、PTX0.6_NF: PTX 0.6 mg 内包ナノファイバー、PTX 0.3_SC: PTX 0.3 mg 皮下注射、PTX0.6_SC: PTX 0.6 mg 皮下注射)

Control 群は約 8 倍の腫瘍成長を示した。NF 群、SC 群では、それぞれ濃度依存的に腫瘍成長を阻害している効果が見られた。PTX0.3_NF と PTX0.3_SC、PTX0.6_NF と PTX0.6_SC をそれぞれ比較すると、SC と比較して NF 群が効果的であることが分かる。これより、徐放が毎週の局所注射より効いていることが分かる。また、唯一 PTX0.6_NF のみが腫瘍の縮退効果が得られた。ここで、1 日目および 7 日目の PTX の概算の投与量を、それぞれの NF および SC で比較してみると、Table 2-2 となる(7 日目の NF からの PTX 放出量は累積放出量)。

Table2-2 NF および SC で投与された PTX の量

Sample	その日における累積 PTX 投与量(μg)				
	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
PTX0.3_NF	5.8	25.0	36.8	48.8	60.8
PTX0.6_NF*	11.6	50.0	73.6	97.6	121.6
PTX0.3_SC	37.5	75.0	112.5	150	187.5
PTX0.6_SC	73.0	147.0	219.0	292.0	365.0

*PTX0.3 放出量の二倍の値

1-8 で紹介した dose-dense therapy の項で、腫瘍の成長は腫瘍サイズに影響するというモデルについて記述した。本章の SC は、毎週の dose-dense therapy と同様のことを行っているが、今回の実験における毎週1回の投与量(37.5 μg および 73 μg)では、腫瘍成長が勝ったと考えられる。PTX0.3_SC と比較して PTX0.6_SC の方が腫瘍成長を阻害しているため、SC を投与したタイミングでは腫瘍に対してある程度作用していることが考えられる。一方で、NF 群に対しては、少量の PTX を極限にまで投与頻度を増加させたと考えることができる(Figure 2-3)。PTX0.3_NF が PTX0.6_SC と同等の結果が見られているが、day 7 において、合計 PTX 投与量は、PTX0.3_NF は 25 μg、PTX0.3_SC は 75.0 μg である。PTX 投与量が少ない NF が、顕著に腫瘍成長阻害を示している。また、PTX0.6_NF と PTX0.6_SC の場合においても、day7 において 50 μg および 147 μg と NF 群が投与量が少ないにも関わらず、唯一縮退効果を示している。NF と SC を比較したこれらの結果から、NF 群による少量でも投与頻度を極限まで上昇させることは治療に有用であることがいえる。さらに *in vitro* の結果で長期間 PTX を腫瘍に暴露することで IC₅₀ 値が減少したことから、腫瘍上に常にあるナノファイバーから放出される PTX の長期暴露が腫瘍縮退に有意に作用したと考えられる。

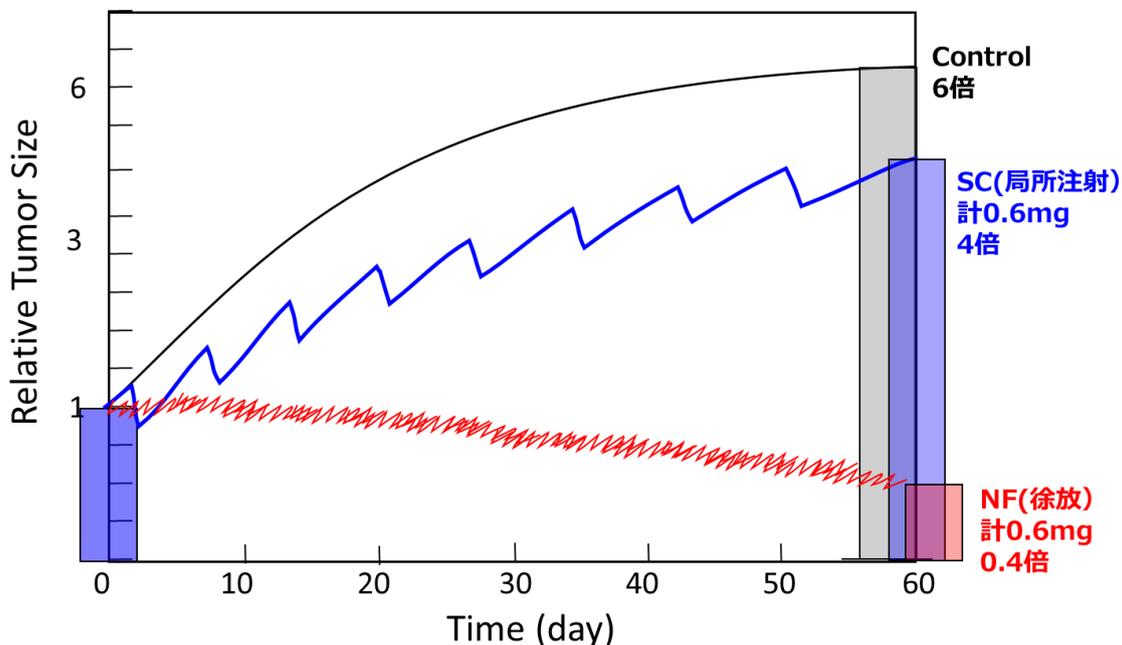


Figure 2-3. 2 か月間の動物実験で得られた結果からのがん成長の挙動の予測

2-4 結言

本章において、疎水性薬剤である PTX を添加剤なしで投与し、かつ副作用を軽減し腫瘍選択的に作用させるため、ナノファイバーを利用した徐放システムの開発を行った。PTX 内包ナノファイバーを電界紡糸法で作製し、一か月以上の徐放に成功した。動物実験で SC と比較して実験を行ったところ、NF からの PTX 放出量は SC による投与量よりも少ないにも関わらず、明らかに腫瘍成長を阻害している結果が得られた。これは徐放が PTX 投与頻度を極限まで増加させていると考えられること、そして局所で PTX が常に腫瘍に暴露すると IC50 値が減少するという *in vitro* の結果から考えることができる。

投与量が少量で可能であることは、副作用の軽減につながり、患者の QOL 向上に貢献できることが期待できる。現在 PTX は主に点滴静注により使用されているが、ナノファイバーを使用した長期徐放により、常に低濃度ではあるが薬剤の有効濃度を維持させ続けることが可能となる。この結果はさらに、現在の治療において週一度の薬剤投与を患者が受けるためには病院で医師の処方が必要になるが、移植ナノファイバーを利用することで病院で注射を受ける必要がないことも利点として挙げられる。

参考文献

1. Miele, E.; Spinelli, GP.; Miele, E.; Tomao, F.; Tomao, S.; Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane®ABI-007) in the treatment of breast cancer. *International Journal of Nanomedicine* **2009**, *4*.
2. Van Natta, FJ.; Hill, JW.; Carruthers, WH, Polymerization and ring formation, epsilon-caprolactone and its polymers. *J Am Chem Soc* **1934**, *56*, 455-9.
3. Huang, S, Biodegradable polymers. In: Mark F, Bikales N, Overberger C, Menges G, Kroshwitz J, editors. *Encyclopedia of polymer science and engineering*. New York: John Wiley and Sons **1985**, 220-43.
4. Pitt, CG., Poly-epsilon-caprolactone and its copolymers. In: Chasin M, Langer R, editors. *biodegradable polymers as drug delivery systems*. New York: Marcel Dekker **1990**, 71-120.
5. Chandra, R.; Rustgi, R., Biodegradable polymers. *Progr Polym Sci* **1998**, *1998* (23), 1273-335.
6. Okada, M., Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progr Polym Sci* **2002**, *27*, 87-133.
7. Nair, LS.; Laurencin, CT., Biodegradable polymers as biomaterials. *Progr Polym Sci* **2007**, *32*, 762-98.
8. Yamori, T.; Sato, S.; Chikazawa, h.; Kadota, T., Anti-tumor efficacy of paclitaxel against human lung cancer xenografts. *J Cancer Res* **1997**, *88*, 1205-1210.
9. Georgiadis, M. S.; Russell, E. K.; Gazdar, A. F.; Johnson, B. E., Paclitaxel cytotoxicity against human lung cancer cell lines increases with prolonged exposure durations. *Clini Cancer Res* **1997**, *3*, 449-454.

第3章 薬物徐放と温熱療法との併用を可能にするナノファイバーの設計

3-1 緒言

本章では、さらに薬剤の効能を向上させることができれば、より少ない量の薬剤で副作用を軽減できる治療が行えることを期待し、温熱と薬物徐放を同時併用できるスマートナノファイバーの設計を行った。様々な薬物と温熱の併用効果については1-6で述べたが、PTXと温熱の併用効果についても報告がされている^{1,2}。これらの報告では、温熱により細胞周期がPTXが作用するG2/M期に細胞を誘導していることが示されている。また、温熱と併用することでIC₅₀値が改善され、アポトーシスがより誘導されていた¹。これらの結果に触発され、第二章で得られた徐放性能に加え、本研究ではさらに温熱を可能とする設計を行った。温熱は、一度温熱すると温熱耐性が生じてしまうために定期的に行えないが、定期的に行われる徐放と定期的に行う温熱を、ナノファイバー単一の材料で行うことを目的とした。

3-2 実験方法

3-2-1 実験試薬

本章で使用した実験試薬を下記に示す。

Table 3-1 3章で使用した実験試薬と購入先.

Reagent	Abbreviations	Company	Location
ϵ -Caprolactone	CL	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Tetrahydrofuran	THF	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
1,4-Butandiol	BD	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Tin (II) ethylhexanoate		Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
Methanol	MeOH	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Diethylether		Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol	HFIP	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PBS	nakalai tesque	Kyoto, Japan
Paclitaxel	PTX	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Butorphanol tartrate		Meiji Seika Pharma Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Medetomidine		Meiji Seika Pharma Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Dormicum injection 10mg		Astellas Pharma Inc.	Tokyo, Japan

Taxol®	TAX	Bristol-Myers Squibb Company	NY, USA
NCI-H23		American Type Culture Collection	Manassas, VA, USA
RPMI 1640 with L-tn		Nacalai Tesque Inc.	Kyoto, Japan
5.0 g/L-trypsin/5.3mmol/L-EDTA solution		Nacalai Tesque Inc.	Kyoto, Japan
antibiotic-antimycotic mixed stock solution		Nacalai Tesque Inc.	Kyoto, Japan
Sodium pyruvate solution		Nacalai Tesque Inc.	Kyoto, Japan
MEM non-essential amino acids solution		Nacalai Tesque Inc.	Kyoto, Japan
Fetal bovine serum	FBS	Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
Female SCID mice		Charles River Laboratories Japan, Inc.	Yokohama, Japan
Alamar blue assay		TREK Diagnostics	Cleveland, OH, USA
Iron(III)oxide nanopowder (<50 nm particle size)		Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
Chloroform-d (containing 0.05wt% TMS) 99.6atom%D (stabilized with Silver chip)		Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan

3-2-2 電界紡糸法

2-2-2 で合成した PCL 900 mg と PTX 6.75 mg もしくは 13.5 mg、そして MNPs を 0.9, 6.0, 12.0, 23.0, もしくは 45.0mg を 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP) 4.5 mL に加え、室温で 12 時間超音波を照射しながら攪拌した。電界紡糸条件を下記の表に示す。PTX 量は 2-2-3 と同様にして計算し(24 mg/kg, 12 mg/kg)、ファイバーを 1 片 40 mg にカットした際の PTX 量が同等になるように決定した。完全に溶解していることを確認した後、PCL 溶液を 22G の針を装着した 5 mL シリンジに充填した。シリンジ内の気泡を抜いたのち、電界紡糸装置に溶液を充填したシリンジを設置した。コレクターにはアルミホイールを使用した。シリンジ-コレクター間距離を 13 cm に固定し、流量と電圧の条件を変えて電界紡糸を行った。各種電界紡糸条件で作製したファイバーの構造は、SEM、energy dispersive X-ray analysis(EDX)解析および transmission electron microscopy(TEM)解析を行った。

3-2-3 ナノファイバーの構造評価方法

ナノファイバー構造は、SEM 観察により行った。ナノファイバーをステージにカーボンテープで固定した後、Pt コーティングを 30 秒間 20 mA で行った。MNPs の内包については、EDX 解析および TEM 観察で評価した。EDX 解析は、マッピングにより MNPs の Fe 元素を検出した。TEM 観察は、TEM グリッドにナノファイバーを電界紡糸で直接噴射して行った。

3-2-4 交流磁場照射時の発熱挙動評価方法

(1) 磁性ナノ粒子溶液の発熱挙動評価

MNPs をそれぞれ 0、10、20、30 mg/mL となるように水に分散した溶液を作製した。これら 4 種類の溶液について、誘導加熱電源装置(HOSHOT2, Alonics Co.)から交流磁場(AMF)を 15 分間照射した際の発熱挙動について、IR-thermo camera(CPA-E6, FLIR)で得られた画像から温度を評価した。さらに AMF 照射を停止した後、5 分間冷却挙動について評価した。照射した磁場の強さは 166kHz, 362 W で行い、電流の設定をそれぞれ 400A, 300A, 200A, 150A, 100A, 0A とした際の発熱挙動を全ての溶液について評価した。

(2) 磁性ナノ粒子内包ナノファイバーの発熱挙動評価

ナノファイバー一片を 40 mg とした際に、MNPs がそれぞれ 0.9, 6.0, 12.0, 23.0, 43.0 mg を内包したナノファイバーを電界紡糸で作製した。ナノファイバーを誘導加熱電源装置(HOTSHOT2, アロニクス社)のコイル部分に置き、交流磁場を照射した。交流磁場の照射は 480 A 設定(実測値 192A)、166kHz で行った。交流磁場照射によるナノファイバーの発熱温度は、IR-サーモカメラ(CPA-E6, FLIR)で観察した。画像から得られた照射時間における観察温度をグラフ化した。

マウスに MNPs ファイバーを移植し、同様にマウス中のナノファイバーの発熱温度を測定した。マウスが三種混合麻酔で睡眠状態にあるときに、背面部の皮下にナノファイバーを移植した。その後、誘導加熱電源装置のコイル部にマウスを寝かせ、交流磁場を照射した。照射開始後からストップウォッチで時間計測をはじめ、一分毎に温度を観察した。観察温度からグラフを作製した。

3-2-5 薬物放出試験方法

PTX 内包ナノファイバーを 40 mg 片にカットし、内包 PTX が 0.3 mg のナノファイバー(PTX 0.3)および 0.6 mg のナノファイバー (PTX 0.6)とした。カットしたナノファイバーを、それぞれ 10 mL サンプル管中で 37°C 下 PBS 5 mL 中に浸漬させた。一定期間毎に 2 mL の PBS をそれぞれのサンプル管から回収し、新たに 2 mL の PBS を加えた。回収したサンプル溶液の吸光度($\lambda=230$ nm)を測定し、下記の式からナノファイバーから放出された PTX 量を同定した。

$$\text{Cumulated released PTX (\%)} = (D_{\text{released}} / D_{\text{total}}) \times 100 \quad (1)$$

D_{released} はその期間までに放出された全 PTX 量を示し、 D_{total} はそのナノファイバーに内包された全 PTX 量を示す。

検量線は 2-2-4 と同様に、PTX を溶解した MeOH : H₂O = 7 : 3 の溶液から作製した。

3-2-6 温熱と薬物の *in vitro* 抗腫瘍評価方法

(1) 濃度の異なる PTX 溶液の準備

まず PTX stock 溶液を準備した。Taxol 溶液(30 mg/5 mL)を PBS で 24 倍希釈し、0.25 mg/mL の PTX 溶液を作製した。この stock 溶液に PBS を加え、下記の 6 種類の異なる PTX 濃度の stock 溶液を準備した。これは 1well に加える PTX 溶液を 50 μ L となるようにして計算している。実際に準備した下記 5 サンプルの stock 溶液量は、下記の μ L \times その濃度の PTX 溶液を加える well 数 で計算した値を準備した。また、表に示した PTX conc.は、細胞と培地がある well に、PTX 溶液を添加した後の濃度を示している。準備した 5 サンプルについて、46 μ m のフィルターでろ過してから次項の方法で細胞に添加した。

Table 3-2 添加した PTX 溶液の濃度と、各濃度の溶液を準備するために添加した 0.25 mg/mL PTX stock 溶液と PBS の量(1 well 当たりの量を示し、各濃度の PTX 溶液は統一して 50 μ L を添加した)

Sample: PTX Conc. μ g/mL	PTX (0.25 mg/mL) μ L	PBS μ L
0	0	50
33	20	30
53	30	20
67	40	10
80	50	0

(2) PTX 溶液の添加と 43°C 温熱方法

2-2-5(1)の方法で NCI-H23 の細胞を培養した。その後の継代で、96well プレート 4 枚(43°C 0 分、43°C 15 分、43°C 30 分、43°C 60 分で各 1 枚)に細胞を 1×10^5 cells/100 μ L/well となるように播種し、37°C、CO₂ 5% で一日インキュベートした。細胞が 80%以上コンフルエント状態であることを確認した後、全ての well の培地を除去した。

まず 43°C 0 分のプレートに、37°C に温めておいた培地を 100 μ L 添加した。その後、前項(1)で準備した 5 種類の濃度の PTX 溶液を 1well に 50 μ L ずつ添加し(n > 3)、37°C、CO₂ 5% のインキュベータに入れ、24 時間培養した。

43°C 15 分、43°C 30 分、43°C 60 分温熱するプレートにおいては、培地を除去した後、43°C の恒温槽で温めた培地を 100 μ L ずつ well に添加した。その後、同様に 43°C に温めた前項(1)で準備した 5 種類の濃度の PTX 溶液を 50 μ L ずつ添加し、43°C CO₂ 5% でインキュベートした。43°C で 15 分経過後、3 枚のうち一枚のプレートを取り出し、37°C のインキュベーターに移動して 23 時間 45 分インキュベートした。続いて 43°C で 30 分経過後、二枚目のプレートを取り出し 37°C のインキュベーターに移し、23 時間 30 分インキュベートした。43°C で 60 分経過後、3 枚目のプレートも同様に 37°C で 23 時間インキュベートした。

(3) Alamar blue による細胞活性評価方法

細胞の活性は、Alamar blue のプロトコルに従って評価した。上記(2)の方法で 24 時間すべてのプレートをインキュベートした後、Alamar blue を 1 well 当たり 20 μ L 添加した(Alamar blue のプロトコルよりサンプルに対して 10% の Alamar blue を添加)。37°C で 1 時間インキュベートし、還元されたレゾルフィンの蛍光を microplate reader (ARVO, Perkin Elmer Japan Co., Ltd., Kanagawa, Japan) で測定した(540-570/580-610 nm)。得られた蛍光強度を細胞数に変換し、細胞生存率を算出した。下記に細胞数と蛍光強度の検量線を示す。

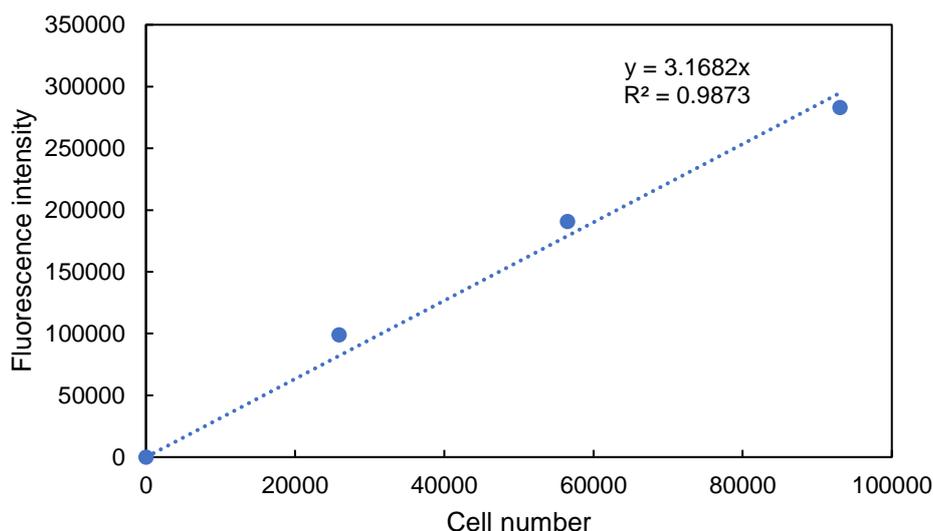


Figure 3-1. Alamar blue assay 時の細胞数と蛍光強度の検量線

3-2-7 ナノファイバーを用いた *in vitro* 抗腫瘍評価方法

3-2-2 で作製した NF(PTX なし)、PTX 0.3_NF、MNP_NF、PTX0.3/MNP_NF をそれぞれ 3 サンプルずつ用意し、24-well plate に入れて 48 時間 37°C でガス滅菌を行った。その後、35 mm dish で培養した細胞を 6 実験群 × 3 サンプル = 18 dish 用意し、1 dish につきファイバーを一片いれ、一日インキュベートした。Dish 中のファイバーを取り除き、alamar blue を 200 μ L 添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。その後、alamar blue の蛍光強度を microplate reader (ARVO, Perkin Elmer Japan Co., Ltd., Kanagawa, Japan) で測定した。得られた蛍光強度の Control の細胞生存率を 100% とし、それぞれのサンプルの生存率を計算した。

3-2-8 動物実験方法

(1) 担癌モデルマウスの作製

2-2-6(1)-(3)の方法で担癌モデルマウスを作製した。

(2) ナノファイバーの移植/PTX の皮下注射

NCI-H23 細胞を皮下注入してから 30 日後、皮下腫瘍部にファイバーを移植した。マウスの治療グループは、9 グループ(治療なし ; control、ファイバー : NF、0.3 mg PTX 内包ファイバー : PTX0.3_NF、0.6 mg PTX 内包ナノファイバー : PTX0.6_NF、MNP_NF : MNPs 内包ナノファイバー、MNP/PTX0.3_NF : PTX 0.3 mg および MNPs 内包ナノファイバー、MNP/PTX0.6_NF : PTX 0.6 mg および MNP 内包ナノファイバー、0.3 mg PTX の皮下注射 : PTX0.3_s.c.、0.6 mg PTX の皮下注射 ; PTX0.6_s.c.)とし、5 匹ずつとした。皮下注射に使用した PTX は、市販されている Taxol® の 30 mg/5 mL を生理食塩水で希釈し、0.3 mg/800 μ L もしくは 0.6 mg/800 μ L とした。皮下注射は一週間に一度行い、0.3 mg/800 μ L を 100 μ L (37.5 μ g)、0.6 mg/800 μ L を 100 μ L (75 μ g) 注射した。注射時は皮下腫瘍の局所に注射し、ファイバーは切開し皮下腫瘍の上に移植した。全てのグループについて、実験開始前に切開して腫瘍サイズを計測し、縫合した。二カ月間の治療後、再び切開して腫瘍サイズを計測した。

3-3 実験結果

3-3-1 ナノファイバーの構造評価

前章 2-3-2 で作製したナノファイバーと比較するため、同様の電界紡糸条件で MNP を内包したナノファイバーを作製した。ファイバー構造を観察した様子を Figure 3-2 に示す。

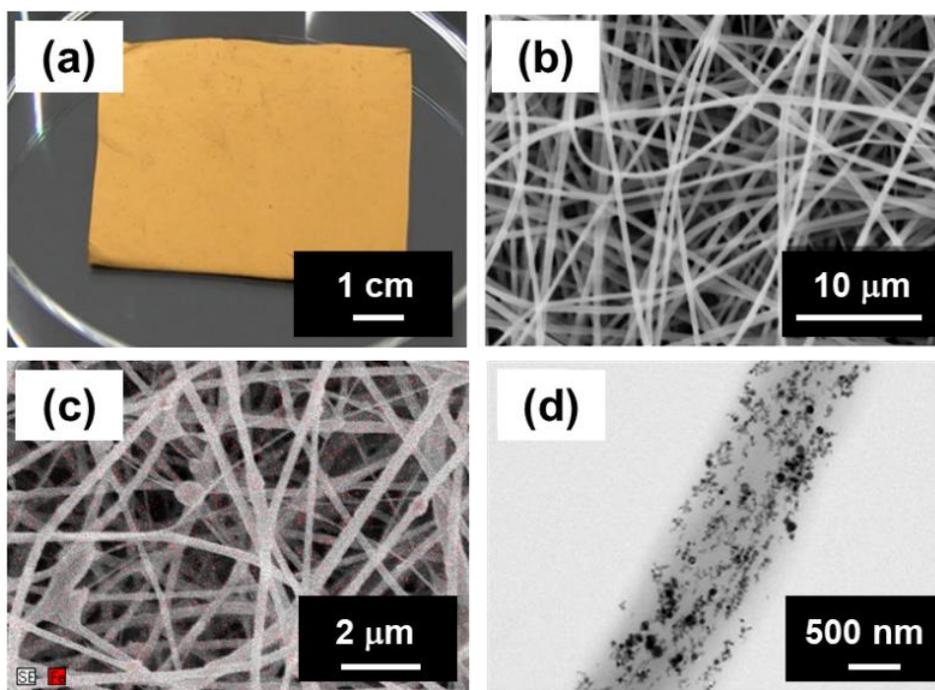


Figure 3-2. (a)作製した MNP/PTX 内包ナノファイバーの外観 (b)SEM 画像 (c) EDX マッピング(Fe:赤ドット) (d) TEM 観察画像

ナノファイバーの外観は茶色となり、これは混合内包した MNPs の色に由来する。SEM 観察写真では、ファイバー径が約 170 nm であることが確認された。このファイバー径は、前章で作製した MNPs なしのファイバーと比較すると、明らかにファイバー径が小さくなっていることが分かる。これは、MNPs を内包することにより、電界紡糸に重要な要因である電導度および粘度が変化されたためと考えられる。さらに Figure 3-2 (c)および(d)では、MNPs がファイバー径全体に分散している様子が確認された。Figure 3-2 (c)では、MNPs の鉄元素の存在が赤いドットで示されている。鉄元素がこの画像全体に分布しているため、ファイバー径全体に Fe が分布していることが分かる。Figure 3-2 (d)では、ファイバー一本中に存在している MNPs 粒子の様子を示している。この写真から、ファイバー一本中には、MNPs が局在していないことが観察された。

3-3-2 交流磁場照射時の発熱挙動評価

(1) 磁性ナノ粒子溶液の発熱挙動評価

まず MNPs の発熱挙動を調査するため、水に分散した MNPs 溶液を作製した(0、10、20、30 mg/mL)。それぞれの溶液について電流 480, 400, 300, 200 150, 100, 0A で AMF を照射した際の発熱温度

を、下記のグラフ(Figure 3-3)に濃度別にまとめた。AMF は 15 分間照射し、AMF 照射停止後さらに 5 分間冷却温度を観察した。

AMF の電流が高いほど、また MNPs 濃度が増加するほど、発熱温度は AMF 照射時間依存的に増加した。この挙動は、MNPs 分散溶液全てにおいて同じ傾向が観察された。

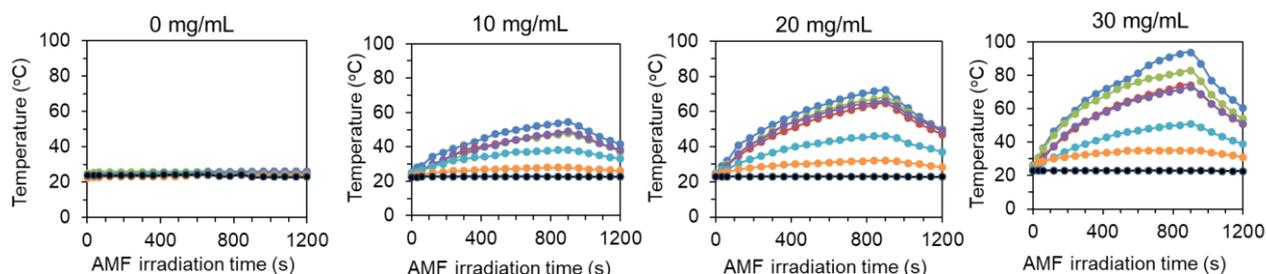


Figure 3-3. 0、10、20、30 mg/mL の MNPs 溶液に、異なる電流の交流磁場を照射した際の発熱挙動 (blue: 480A, red: 400A, green: 300A, purple: 200A, aqua: 150A, orange: 100A, black: 0A)。

(2) 磁性ナノ粒子内包ナノファイバーの発熱挙動評価

交流磁場照射中の発熱温度を、サーモカメラからの観察画像から評価した。結果を Figure 3-4 に示す。

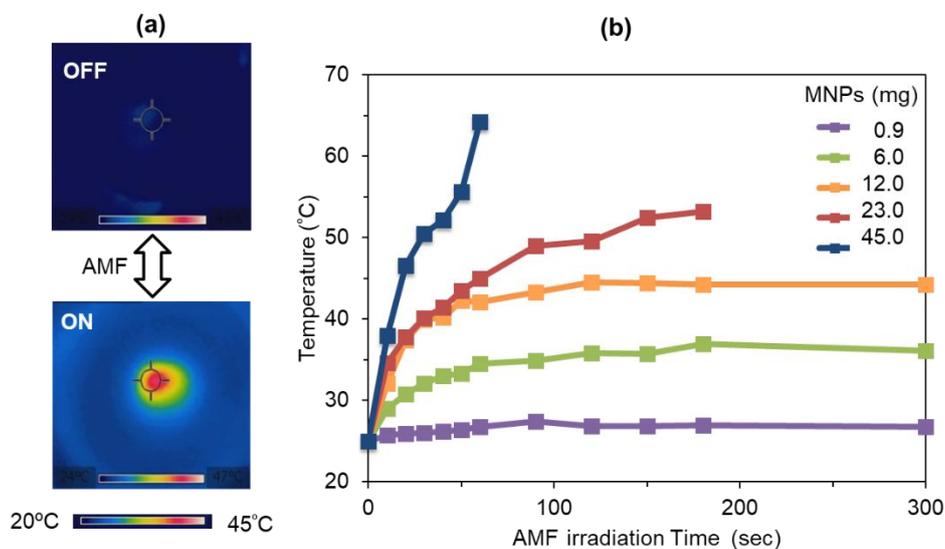


Figure 3-4. (a) 交流磁場照射前後の MNP_NF の温度変化画像 (b) 様々な MNPs 内包量のファイバーの交流磁場照射中の温度変化を表したグラフ

交流磁場照射前はナノファイバーは 25°C であるが、交流磁場を照射後、ナノファイバーの温度は速やかに上昇した(Figure 3-4(a))。MNP 内包量に依存して、最大発熱温度は異なっていた。MNP を内包したファイバーは、全て交流磁場照射により温度上昇が可能であった。ファイバーに担持させる MNPs 量を増加させた際の発熱温度を Figure 3-4(b)に示す。発熱温度は内包した MNPs 量依存的に増加し、内包量が 0.9 mg, 6.0 mg, 12.0 mg のファイバーにおいては、発熱温度は AMF 照射後 60 秒後にはほぼ一定の値であることが確認

された。Figure 3-3 の MNPs 溶液の場合では、AMF 照射中は温度は一定とならず、温度上昇を続けていた。これは Figure 3-4 のナノファイバー中に内包した MNPs の発熱挙動とは異なっている。これは水中では温度が短時間で冷却しにくいこと、またファイバー内に MNPs が固定化されて自由に動けないことから、このような差が生じると考えられる。Figure 3-4 から、温熱治療に最も適した温度(43℃~45℃)に発熱する MNPs 量は、12.0 mg であった。これより、今後の実験で使用するナノファイバーの MNPs 量は、12.0 mg (ポリマーに対して 30w/w%内包)とした。

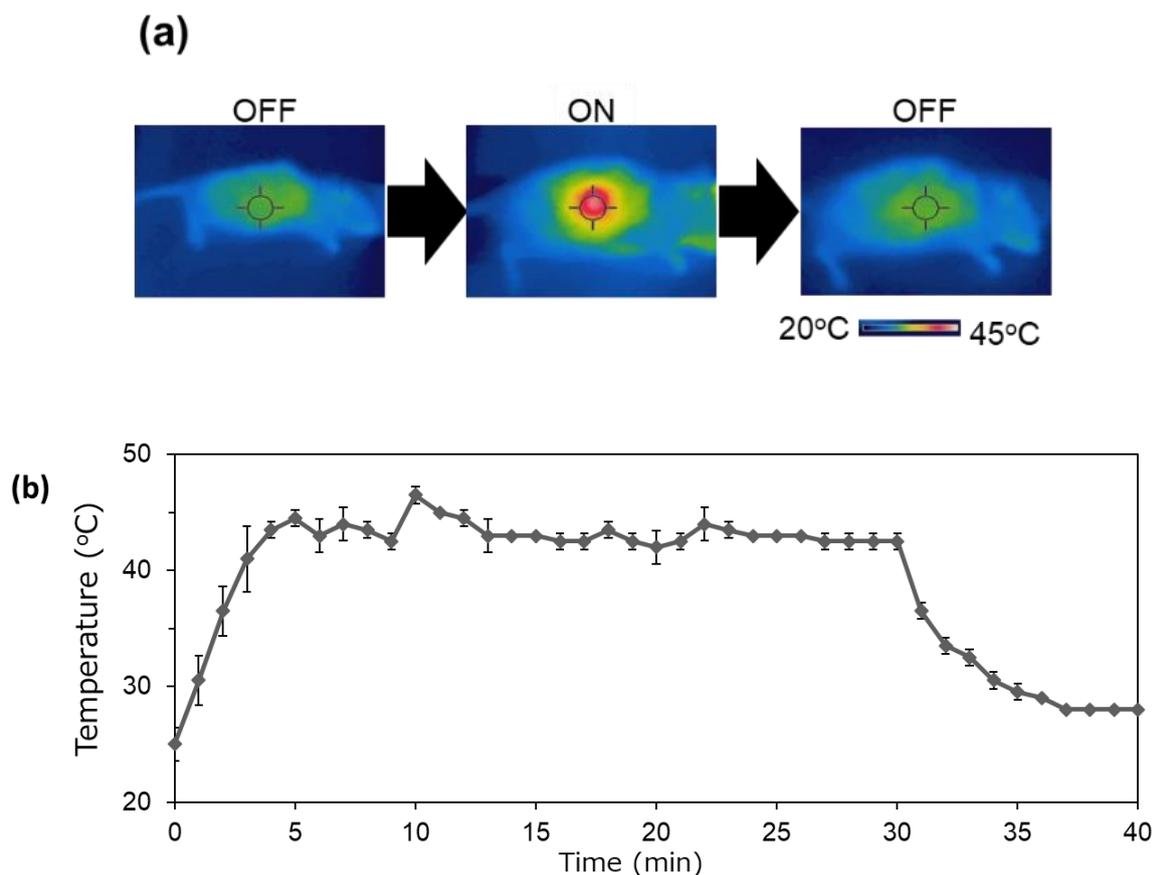


Figure 3-5. マウスに移植した MNP_NF の発熱評価。(a) 交流磁場照射前後に観察されたサーモカメラの画像 (b)交流磁場照射後に観察された移植した MNP_NF の温度変化を表したグラフ。30分交流磁場を照射し、続く 10 分間は交流磁場照射停止後に観察された冷却課程を示す。

動物に実際に移植した際に、同様に発熱が可能であるか評価を行った。マウスの背面部に移植した MNPs _NF に交流磁場を照射し、時間ごとの発熱温度の変化を計測した(Figure3-5)。移植したナノファイバーも、Figure 3-4 と同様に、AMF 照射後にナノファイバーの温度上昇が観察され、AMF 停止後は温度の下降が確認された(Figure 3-5(a))。さらに移植したナノファイバーの発熱挙動を Figure 3-5(b)に示す。最初の 30 分間は交流磁場照射時におけるナノファイバーの発熱温度を示し、30~40 分間は交流磁場照射停止後の温度変化である。交流磁場の照射後、温度は速やかに上昇し、5 分後には 45℃に達した。その後、25 分間にわたり、交流磁場照射中は発熱温度は 40~45℃で一定の温度幅を維持した。交流磁場照射停止後、温度は速やかに下降し、6 分後には交流磁場照射前の温度とほぼ同じ 27℃にまで下降した。

これより、MNP_s_NF は、生体内にあっても空気中と同等の発熱能力を維持できることが明らかとなった。また、12.0 mg の MNP_s 内包は、温熱に適した温度を交流磁場照射中において維持できることが分かった。

3-3-3 薬物放出評価

AMF 照射による薬物放出挙動への影響を調査した。AMF 照射を一週間に一度 15 分行い、発熱させた群を MNP_NF (AMF) とし、AMF 照射を行わない群を MNP_NF とし、下記のグラフに表した。比較として、前章で示した PTX_NF を NF とした。内包している PTX は、どれも 0.3 mg を内包し、0.3 mg を 100% としてあらわしている。

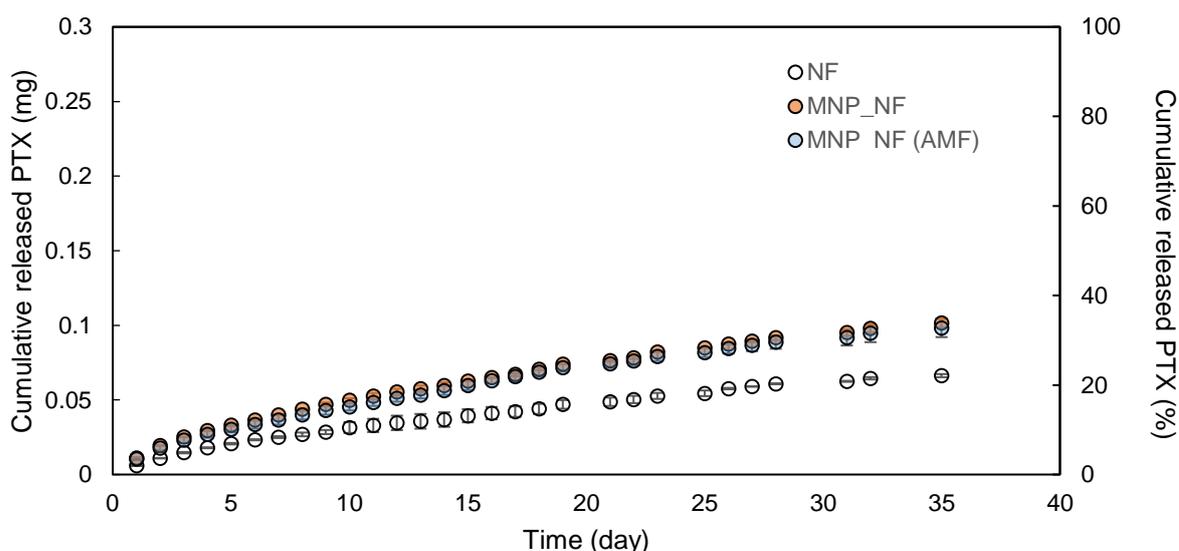


Figure 3-5. MNP_NF の薬物放出挙動。MNP_NF (AMF) は、7 日ごとに交流磁場を照射して発熱させた。NF は前章の PTX_NF の放出挙動を示す。

結果は、MNP_NF 群において、AMF 照射の有無に関わらず放出挙動に顕著な違いは見られなかった。どちらの群も、30 日以上徐放を示し、放出量は 31% (93 μ g) であった。この結果を前章で作製した NF 群 (30 日目) で 60 μ g (20% 放出) と比較すると、1.5 倍高い放出量を示している。発熱させていない群 (NF と MNP_NF) の放出量の違いは、恐らくファイバー径の違いが考えられる。NF はファイバー径が約 900 nm であったのに対し、MNP_NF はファイバー径が 170 nm である。一般的に、ファイバー径が細いほど表面積が大きくなり、水中に薬物が暴露しやすくなるため、放出量は増加する。一方で、薬物は高い温度にある場合に拡散しやすくなるために放出量が増加するが、その場合発熱している MNP_NF (AMF) の放出量が増加すると考えられる。しかし、本実験で得られた MNP_NF 群の放出データは、同等である。実際に、PTX_NF を 37°C および 43°C で薬物放出試験を行ったデータを比較しても (Figure 3-6)、放出挙動はほぼ同じである。

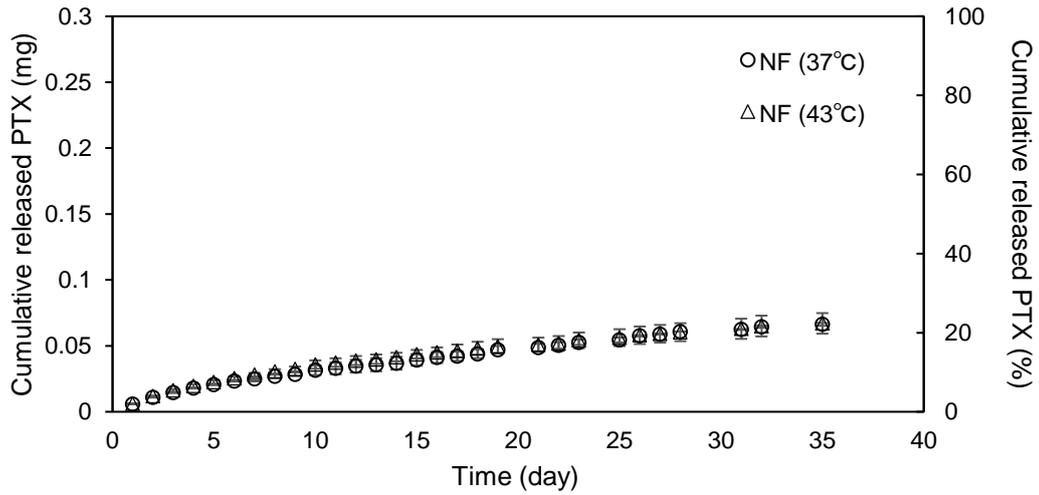


Figure 3-6. PTX 内包ナノファイバーの 37°C もしくは 43°C における薬物放出挙動

これら温度を変えても薬物放出がほぼ同程度であるという結果について考察するため、交流磁場照射時のファイバー構造変化および PCL の結晶性について評価した。

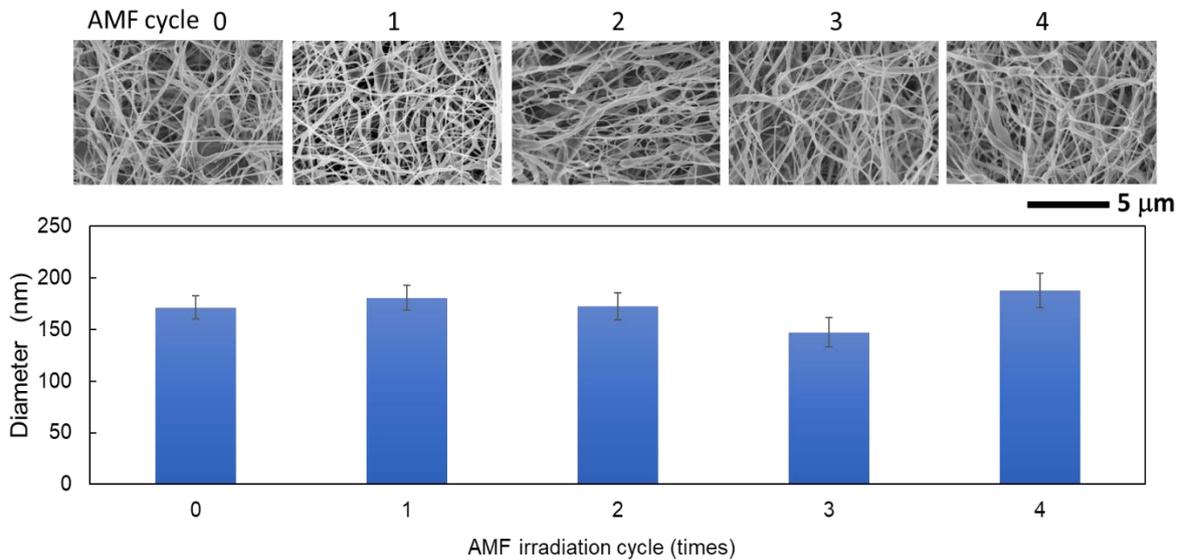


Figure 3-7. 交流磁場照射(0-4回)後の MNPs_NF のファイバー構造を観察した SEM 画像と、ファイバー径の測定結果

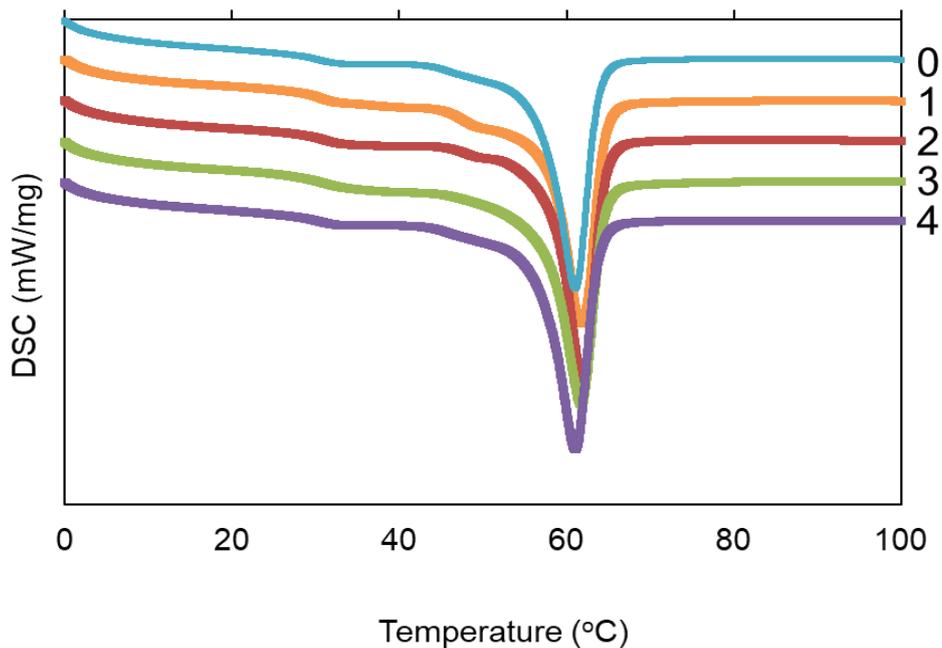


Figure 3-8. 交流磁場照射(0-4回)後の MNP_NF の DSC

Figure 3-7 は AMF 照射後 0-4 回のそれぞれのファイバー構造およびファイバー径を示す。結果は、AMF 照射によってファイバー構造やファイバー径の顕著な変化は観察されなかった。これより、AMF 照射によって生じた発熱がファイバー構造に影響を及ぼさないということが分かる。Figure 3-8 は、MNP_NF の DSC カーブを示す。本研究で使用した PCL は、60°C 付近に融点を有することが分かる。本章で目的とする MNP の発熱は、温熱に適した 43°C に発熱するように設計している。この DSC カーブでは、43°C 付近では DSC の結晶性変化は非常に緩やかで、ほぼ生じていないと考えられる。これより、Figure 3-5 の MNP_NF の AMF 照射で温度上昇しているにも関わらず放出挙動がほぼ同じであること、および Figure 3-6 の PTX 内包 NF の 37°C もしくは 43°C の PBS 中で行った薬物放出試験がほぼ同じであることは、以下の理由が考えられる。43°C への AMF による一時的な発熱は；①ファイバー構造に影響しない。②PCL の結晶性変化を生じさせるほどではない。これより、本章で作製したファイバーは、PTX の徐放と 43°C の温熱がそれぞれ安定して行えると考えられる。

3-3-4 温熱と薬物の抗腫瘍評価

前項でナノファイバーからの徐放と温熱が安定して独立して行えていることが明らかとなったため、続いて温熱と PTX の併用効果について検討した。PTX 濃度は(0, 33, 53, 67, 80 $\mu\text{g/mL}$)の 5 種類で検討し、これに 43°C の温熱をそれぞれ 0 分、15 分、30 分、60 分行った際の細胞生存率を評価した(Figure 3-9)。

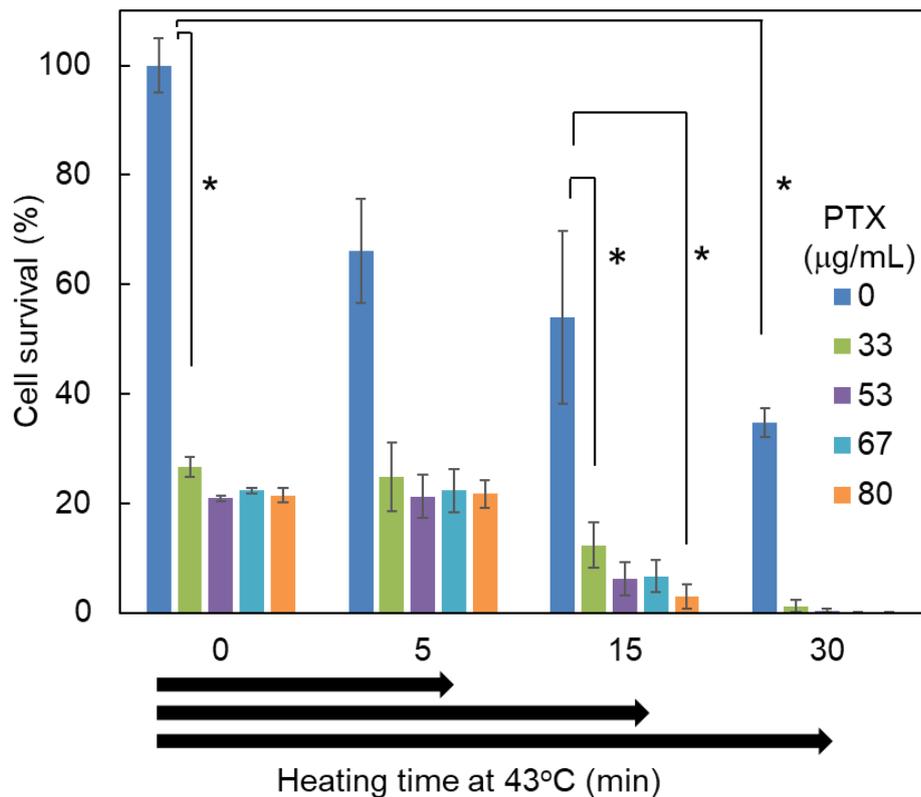


Figure 3-9. PTX(0-80 µg)と温熱 (0-60 分)の併用による細胞生存率の変化

PTX 0 µg/mL の際、温熱時間依存的に殺細胞効果が増加していることが分かる。これは、NCI-H23 細胞は温熱が優位に作用することを意味している。温熱時間が 0 分の場合では、PTX 濃度依存的に殺細胞効果が見られている。また、温熱時間が 15 分の場合で特に PTX 濃度依存的に殺細胞効果が見られている。同じ PTX 濃度で温熱時間の変化に着目すると、温熱時間が増加 15 分以上で、殺細胞効果が増強されていることが分かる。例えば、PTX 33 µg/mL において、温熱時間が 0 分および 5 分では 25% の細胞生存率を示すが、15 分の温熱で 15% に減少している。これより、NCI-H23 細胞は PTX と温熱の併用が優位に作用できることが分かる。

3-3-5 ナノファイバーを用いた *in vitro* 抗腫瘍評価

NCI-H23 細胞が温熱と PTX に対して優位に作用することが分かったため、実際に本章で作製したナノファイバーの温熱と PTX 徐放による併用効果について *in vitro* で検討した。PTX は 0.3 mg 内包し、PTX_NF, MNP_NF, PTX/MNP_NF, NF, AMF 群でそれぞれ検討を行った。結果を Figure 3-10 に示す。

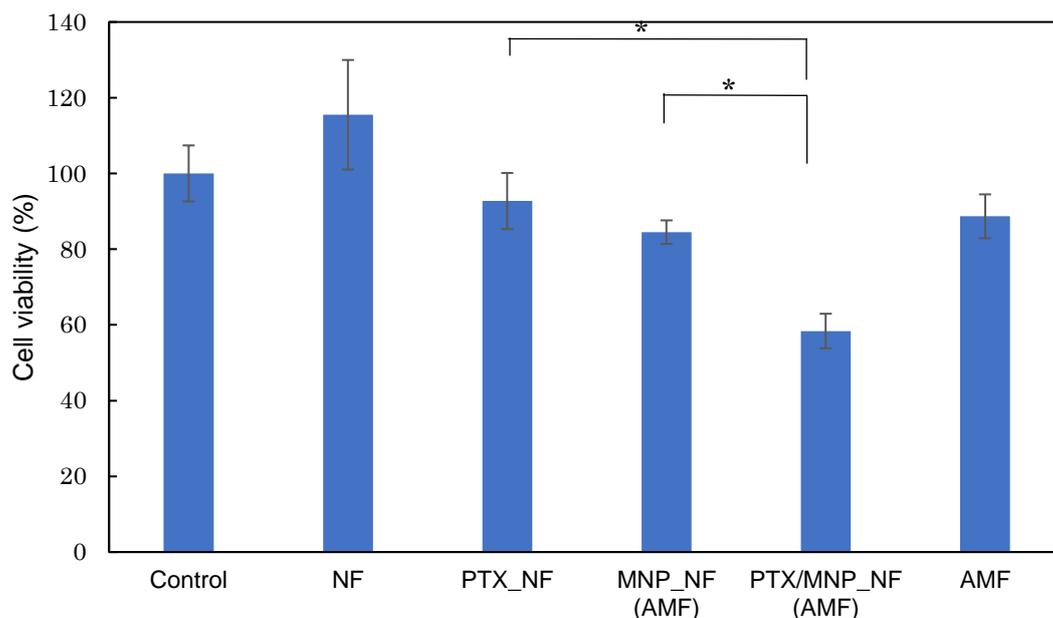


Figure 3-10. NCI-H23 に対する各ナノファイバーによる抗腫瘍効果(*p<0.05)

Figure 3-5 より、一日目の MNP_NF の PTX 放出量は約 10 μg である。本実験では 35 mm dish に培地を 3 mL 添加して実験を行ったため、1 日後にファイバーから放出された PTX 濃度は、3.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となる。この値は、Figure 2-5 のグラフより、細胞生存率は 90%以上であると予測される。Figure 3-10 の PTX_NF 群は、実際に細胞生存率 93%を示した。一方で、温熱について評価した MNP_NF (AMF)では、PTX_NF よりもやや殺細胞効果が表れ、84%の細胞生存率を示した。Figure 3-9 の温熱時間 15 分、PTX 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 55%の細胞生存率を示しているが、この違いはナノファイバーの温熱は培地中にあるナノファイバーから生じているため、培地全体が温熱されるまでのタイムラグが原因と考えられる。一方で、徐放と温熱を併用した PTX/MNP_NF (AMF)は、細胞生存率が 58%を示した。これは Figure 3-9 において PTX 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で温熱 15 分の値と同等の結果であった。前述したように MNP_NF の結果から温熱にタイムラグが生じるため、温熱時間が 15 分より短い可能性が考えられるが、この温熱と放出された 10 μg の PTX の組み合わせにより、MNP_NF (AMF)および PTX_NF より効果が増強されたと考えられる。

また、AMFおよびNF自体の細胞毒性について評価を行ったが、NFにおいては細胞生存率は 115%と control よりやや高く、AMF 照射群においては、88%の値であった。

3-3-6 動物実験評価

細胞実験にて、ナノファイバーによる温熱と PTX の併用効果が確認できたため、続いて動物実験にてその効果を検討した。細胞実験では 0.3 mg の PTX を内包したファイバーを使用した。さらに 0.6 mg の PTX を内包したナノファイバーを用意した。3-2-8(2)に示した 9 グループで腫瘍の成長について評価した。結果を Figure 3-11 に示す。

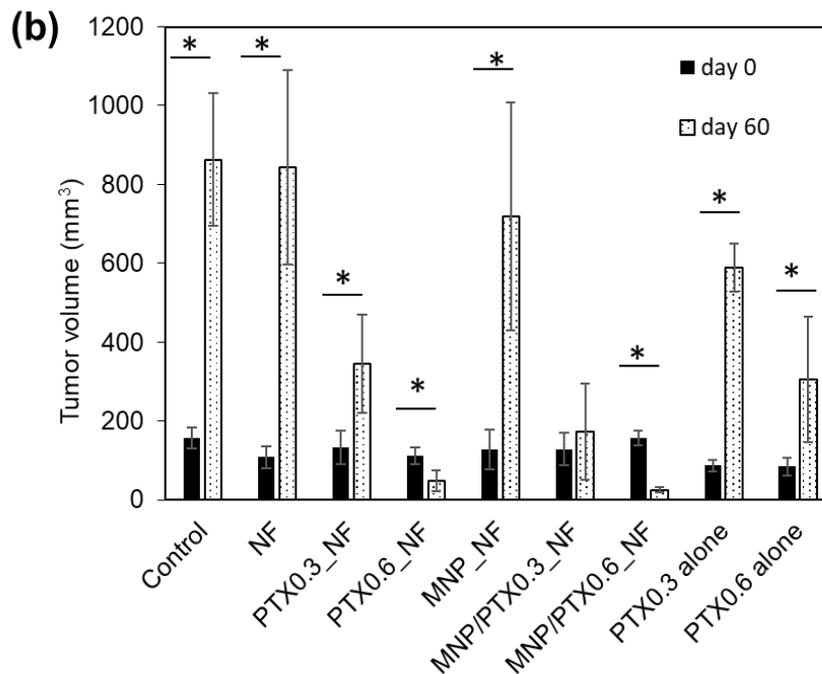
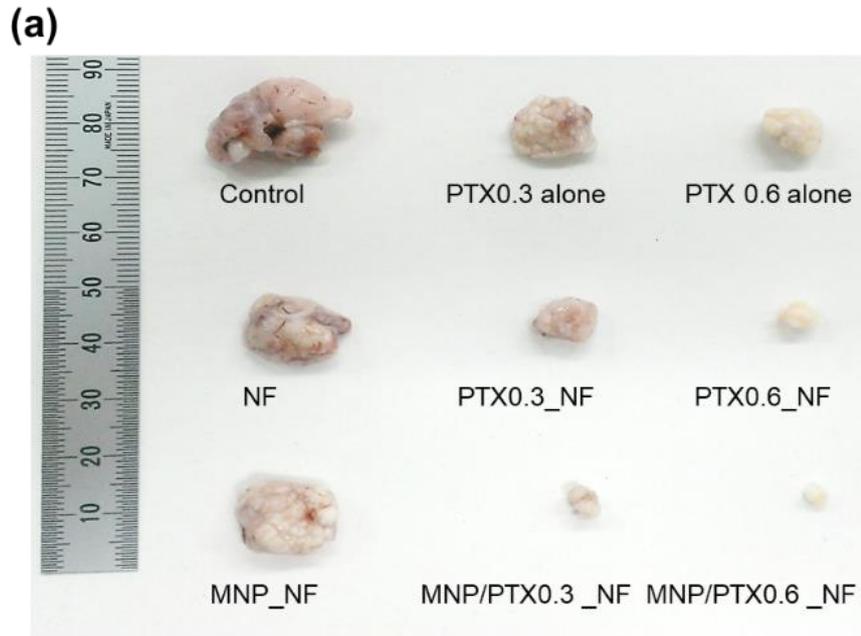


Figure 3-11. 二カ月間のナノファイバー移植もしくは局所注射による腫瘍サイズ変化の検討 (a)各治療グループの二か月後の腫瘍の画像 (b)二カ月前後の体積を示したグラフ(* $p < 0.05$)

Control 群は、腫瘍サイズを二カ月間で約 6 倍の腫瘍成長を示した。同じく MNP および PTX を内包しない NF においても、同等の結果が見られた。これは、*in vitro* でも観察されたように、NF は腫瘍に対して毒性を持たないことを意味する。MNP_NF も同様に *in vitro* ではわずかにしか抗腫瘍効果を示さなかったが、結果は control と比較してやや腫瘍成長を阻害している効果が見られた。PTX0.3_NF および PTX0.6_NF は、2-3-5 で述べた理由により、抗腫瘍効果が見られている。興味深い結果は、温熱単体では全く効果がないが、

ここに少量でも薬剤が加わることで、その効果が飛躍的に向上している点である。MNP/PTX 群を見ると、PTX0.3_NF は 2.6 倍のサイズ変化が見られたが、MNP/PTX0.3_NF はより腫瘍成長を阻害しており、二カ月間で腫瘍サイズ 1.3 倍の成長を示した。また、PTX0.6_NF は 2.3 倍の腫瘍縮退効果を示しているのに対し、MNP/PTX0.6_NF は 6 倍腫瘍を縮退させた。これは、2-3-5 で述べた徐放による効果に加え、温熱が PTX の薬効を向上させているためと考えられる。これらの結果について、前章と同様に、dose-dense therapy の効果に温熱を組み合わせた場合のがん成長挙動について推察した(Figure 3-12)。ファイバーによる徐放の場合は、前章と同様に dose-dense の効果が表れていると考えられる。一方で一週間に一度の温熱と組み合わせた場合、温熱かけたタイミングで温熱と薬物の相乗効果により効果的に抗がん作用が表れていると考えられる。

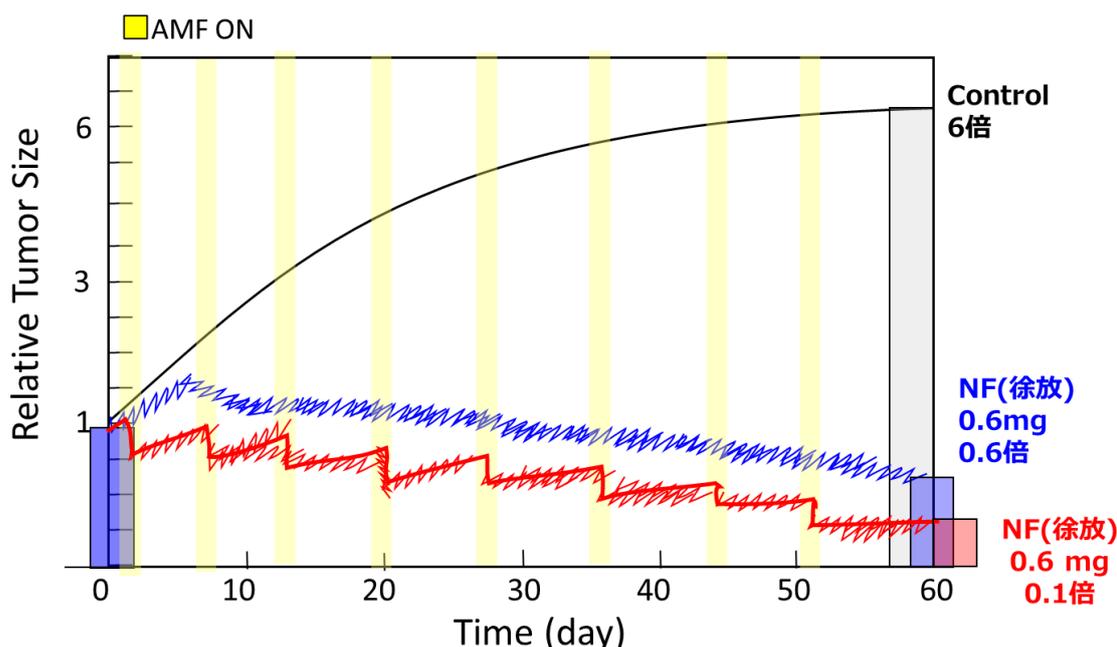


Figure 3-12. 2 か月間の動物実験で得られた結果からのがん成長の挙動の予測

3-4 結言

本章において、前章で達成した疎水性薬剤 PTX の徐放に加え、更なる薬効向上の目的で温熱を併用できる材料：MNPs を組み合わせた。MNPs は交流磁場に応答して発熱可能であり、誘導加熱電源装置の交流磁場照射操作により、発熱時間・ON-OFF を制御可能である。AMF 照射によって内包した MNPs は発熱するが、この発熱はファイバー構造や PCL の結晶性には影響しないために徐放能には影響しない。結果として AMF 照射による発熱と、PTX の徐放が独立して安定に行えることが分かった。

ファイバーから放出される PTX 量は少量ではあるが、前章で述べたように徐放により腫瘍成長を皮下注射と比較して優位に阻害する結果が見られた。興味深いことに、*in vitro* および *in vivo* で、MNP_NF による温熱のみ行った腫瘍に対してはほとんど抗腫瘍効果が見られなかったが、これに PTX 徐放が加わると優位に抗腫瘍効果を発現することが分かった。

この結果は、少量の PTX 徐放に加え、温熱を組み合わせることで飛躍的に抗腫瘍効果を増強することを示唆する。徐放単独よりも、より抗がん剤量の削減および副作用の低減より、患者の QOL 向上に貢献できる。

参考文献

1. Lin, Y.; Liu, Z.; Li, Y.; Liao, X.; Liao, S.; Cen, S.; Yang, L.; Wei, J.; Hu, X., Short-Term Hyperthermia Promotes the Sensitivity of MCF-7 Human Breast Cancer Cells to Paclitaxel. *Biol. Pharm. Bull* **2013**, *36*, 376-383.
2. Cividalli, A.; Cruciani, G.; Esther, L.; Pasqualetti, P.; Tirindelli Danesi, D., Hyperthermia enhances the response of paclitaxel and radiation in a mouse adenocarcinoma. **1999**.

第4章 薬物の ON-OFF 放出と温熱療法を可能にするナノファイバーの設計

4-1 緒言

近年時間治療と呼ばれる治療法が注目を集めており、一日の体内の動態や、どの時間帯にどのような疾患が発症しやすいかが研究されている¹。3章では徐放と温熱の併用で効能の増強を目的としたが、本章においては、時間治療のように、薬物を効果的に作用させるタイミングを細胞に発現させ、かつ薬物放出も同時に行うことで、より効果的な治療となることを期待した。具体的には、細胞を温熱させることにより、PTXが作用するM2期に細胞周期を誘導させ、その同じタイミングでPTXを放出させる。これより、抗がん剤を作用させるタイミングと、抗がん剤放出のタイミングを同時制御させるナノファイバーの設計とした。

4-1-1 Poly(*N*-isopropylacrylamide) とは

本章において、ファイバーを構成する高分子として刺激応答性高分子の一つである poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)に着目した。PNIPAAmは、ある温度を境として相転移を生じ可逆的にその親疎水性を変化させることができる²。PNIPAAmは下限臨界溶解温度(lower critical solution temperature: LCST)型の高分子である。LCST型高分子は、相転移時のエントロピー変化は小さいが、高分子の周囲の水分子のエントルピーおよびエントロピーが支配的となることでLCST型相転移が誘起される。PNIPAAmは、高分子に水和している水分子同士の協同性により、分子量依存性の少ないLCST型の相転移が現れる。PNIPAAm溶液の相転移は、高分子と周囲の水分子の水素結合に起因する水和と脱水和によって生じる。PNIPAAmの相転移温度は32℃である。本章の目的では、温熱により細胞周期の誘導を行い、さらに抗がん剤放出も同時に行う。つまり、温熱時にPNIPAAmの脱水和を伴う相転移を生じさせることで、温熱のタイミングで薬物放出も同時制御するように設計する。そのために、比較的温熱温度に近い32℃に相転移温度を有するPNIPAAmを選択し、その相転移温度をより温熱温度に近い43℃付近に、以下実験項に示す方法で相転移温度を制御した。

4-2 実験方法

4-2-1 実験試薬

本章で使用した試薬を下記のリストに示す。

Table 4-1 4章で使用した試薬リスト。

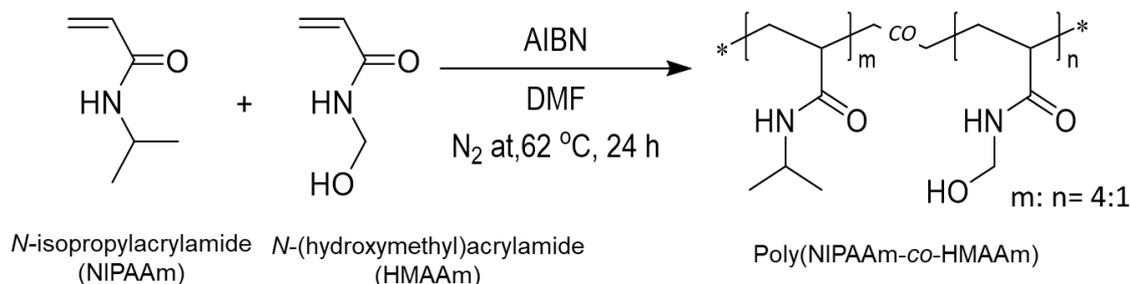
Reagent	Abbreviations	Company	Location
Methanol	MeOH	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol	HFIP	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PBS	nakalai tesque	Kyoto, Japan
Paclitaxel	PTX	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan

Butorphanol tartrate		Meiji Seika Pharma Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Medetomidine		Meiji Seika Pharma Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Dormicum injection 10mg		Astellas Pharma Inc.	Tokyo, Japan
Taxol®	TAX	Bristol-Myers Squibb Company	NY, USA
NCI-H23		American Type Culture Collection	Manassas, VA, USA
RPMI 1640 with L- <i>ln</i>		Nacalai Tesque Inc.	Kyoto, Japan
5.0 g/L-trypsin/5.3mmol/L-EDTA solution		Nacalai Tesque Inc.	Kyoto, Japan
antibiotic-antimycotic mixed stock solution		Nacalai Tesque Inc.	Kyoto, Japan
Sodium pyruvate solution		Nacalai Tesque Inc.	Kyoto, Japan
MEM non-essential amino acids solution		Nacalai Tesque Inc.	Kyoto, Japan
Fetal bovine serum	FBS	Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
Female SCID mice		Charles River Laboratories Japan, Inc.	Yokohama, Japan
Alamar blue assay		TREK Diagnostics	Cleveland, OH, USA
Iron(III)oxide nanopowder (<50 nm particle size)		Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
<i>N</i> isopropylacrylamide	NIPAAm	KJ Chemical Corporation	Tokyo, Japan
<i>N</i> hydroxymethylacrylamide	HMAAm	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
2'2'-Azobis(isobutyronitrile)	AIBN	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Dimethylformamide	DMF	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Hexadeuterodimethyl Sulfoxide 99.9atom%D		Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan

4-2-2 Poly(*N*isopropylacrylamide-*co-N*hydroxymethylacrylamide)の合成と構造評価方法

NIPAAm (100, 80, 70, 60 mol %), *n*-hydroxymethylacrylamide (HMAAm) (0, 20, 30, 40 mol %) および AIBN (合成モノマー濃度の0.01 mol %)を20 mL DMFに溶解した。合計モノマー濃度は50 mmolとした。完全にモノマーを溶解した後、凍結脱気を4回行い、窒素置換を行った。60°Cで20時間反応させた。その後、透析膜に反応液を全て移し、AIBNおよび未反応のモノマーを除去するため、エタノール溶液で2日透析を行った。その後、蒸留水でさらに4日間透析を行った。その後透析膜内の共重合体を、凍結乾燥を4日行うことで乾燥固体を得た。合成した共重合体の構造は¹H-NMR (JEOL, Tokyo, Japan)で同定した。さらに数平均

分子量(M_n)および多分散性(PDI)をgel permeation chromatography (GPC, JASCO International, Tokyo, Japan)で決定した。LiBr 10 mMを含むDMFを溶離液として使用した。温度依存の濁度変化は、UV-Visible spectrophotometer (JASCO corporation, Tokyo, Japan)で行い、PBS中ポリマー濃度を2 mg/5 mLで計測した(温度上昇率: 1.0 °C/min)。相転移温度は、濁度変化が50%となる部分で決定した。



Scheme 4-1. Poly(NIPAAm-co-HMAAm)の合成

4-2-3 ナノファイバーの作製と構造評価方法

4-2-2 で合成した NIPAAm-co-HMAAm 900 mg と PTX 6.75 mg もしくは 13.5 mg、そして MNPs を HFIP 4.5 mL に加え、室温で 12 時間超音波を照射しながら攪拌した。PTX 量は文献の動物実験に使用した量(24 mg/kg, 12 mg/kg)を参考にし⁴⁵、ファイバーを 1 片 40 mg にカットした際の PTX 量が同等になるように決定した。完全に溶解していることを確認した後、溶液を 22G の針を装着した 5 mL シリンジに充填した。シリンジ内の気泡を抜いたのち、電界紡糸装置に溶液を充填したシリンジを設置した。コレクターにはアルミホイルを使用した。シリンジ-コレクター間距離を 13 cm に固定し、流量と電圧の条件を変えて電界紡糸を行った。各種電界紡糸条件で作製したファイバーの構造は、SEM、EDX 解析および TEM 解析を行った。さらに、ファイバーの LCST についても 4-2-2 と同様に濁度変化から決定した。ファイバーはガラス基板に紡糸し、UV 測定用セルのサイズに合わせて長方形にカットした。セル中に立てかけるようにしてファイバーを紡糸したガラス基板を入れ、PBS を 5 mL 加えて濁度変化を測定した。

4-2-4 ナノファイバーの熱架橋方法

水中下で安定な構造を維持させるため、HMAAm 基の熱架橋反応を行った。130°Cで行い、加熱時間を 6 時間から最大 72 時間行い、メチロール基の有無について FT-IR によって評価した。

4-2-5 ナノファイバーの膨潤・収縮挙動評価方法

原子間力顕微鏡(AFM; MFP-3D origin, Oxford Instruments plc, Oxon, UK)観察により、ナノファイバーの構造変化を観察した。まず、空気中にある乾燥状態のファイバー(4.2 mg)の構造観察を行った。その後、水 1 mL をサンプルホルダー部にシリンジで注入し、15 分間ファイバーを膨潤させた。その後、室温でファイバー構造を観察した。その後、ヒーターにより 50°C で 30 分間加温し、構造を観察した。ファイバーはカバーガラス上に直接電界紡糸を行った。

4-2-6 交流磁場照射時の温熱挙動評価方法

ナノファイバー一片を 40 mg とした際に、MNP_s がそれぞれ 0.9, 6.0, 12.0, 23.0, 43.0 mg を内包したナノファイバーを電界紡糸で作製した。ナノファイバーを誘導加熱電源装置(HOSHOT2、480 A, 192 kHz frequency, 362 W)のコイル部分に置き、交流磁場を照射した。交流磁場の照射は 480A(実測値 192A)、166kHz で行った。交流磁場照射によるナノファイバーの発熱温度は、IR-サーモカメラ(CPA-E6)で観察した。画像から得られた照射時間における観察温度をグラフ化した。

4-2-7 薬物放出評価

(1)長期薬物放出試験方法

PTX 内包ナノファイバーを 40 mg 片にカットし、内包 PTX が 0.3 mg のナノファイバー(PTX 0.3)とした。カットしたナノファイバーを、それぞれ 10 mL サンプル管中で 25°C、37°C、43°Cのいずれかの温度で、PBS 5 mL 中に浸漬させた。一定期間毎に 2 mL の PBS をそれぞれのサンプル管から回収し、新たに 2 mL の PBS を加えた。回収したサンプル溶液の吸光度($\lambda=230$ nm)を測定し、下記の式からナノファイバーから放出された PTX 量を同定した。

$$\text{Cumulated released PTX (\%)} = (D_{\text{released}} / D_{\text{total}}) \times 100 \quad (1)$$

D_{released} はその期間までに放出された全 PTX 量を示し、 D_{total} はそのナノファイバーに内包された全 PTX 量を示す。

検量線は 2-2-4 と同様に、PTX を溶解した MeOH : H₂O = 7 : 3 の溶液から作製した。

(2)交流磁場によって誘導された発熱による薬物放出試験方法

MNP/PTX_NF 40 mg を 500 μ L の PBS に室温で 15 分間浸漬して膨潤させた。その後、誘導加熱電源装置のコイル部にファイバーを置き、AMF を 15 分間照射した。その後ファイバーが収縮し、圧搾放出された PBS 溶液を回収した(約 150~300 μ L)。その後室温に戻し、500 μ L の PBS を添加し、再度 15 分間膨潤させた。この膨潤 15 分間、AMF 照射 15 分間、サンプル回収のサイクルを 8 回繰り返し、AMF 照射後毎に回収したサンプルに含まれる PTX 濃度を、吸光度を測定して決定した。

4-2-9 ナノファイバーを用いた *in vitro* 抗腫瘍評価方法

4-2-3,4 で作製した NF(PTX なし)、PTX 0.3_NF、MNP_NF、PTX0.3/MNP_NF をそれぞれ 3 サンプルずつ用意し、24-well plate に入れて 48 時間 37°C でガス滅菌を行った。その後、35 mm dish で培養した細胞を 7 実験群 \times 3 サンプル = 21 dish 用意し、1 dish につきファイバーを一片入れ、一日インキュベートした。Dish 中のファイバーを取り除き、alamar blue を 200 μ L 添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。その後、alamar blue の蛍光強度を microplate reader (ARVO, Perkin Elmer Japan Co., Ltd., Kanagawa, Japan)で測定した。得られた蛍光強度の Control の細胞生存率を 100%とし、それぞれのサンプルの生存率を計算した。

4-2-10 動物実験方法

(1)担癌モデルマウスの作製

2-2-6(1)-(3)の方法で担癌モデルマウスを作製した。

(2)ナノファイバーの移植/PTX の皮下注射

NCI-H23 細胞を皮下注入してから 30 日後、皮下腫瘍部にファイバーを移植した。マウスの治療グループは、5 グループ(治療なし; control、ファイバー: NF、0.3 mg PTX 内包ファイバー: PTX0.3_NF、MNP_NF: MNPs 内包ナノファイバー、MNP/PTX0.3_NF: PTX 0.3 mg および MNPs 内包ナノファイバー、0.3 mg PTX の皮下注射: PTX_injection)とし、5 匹ずつとした。皮下注射に使用した PTX は、市販されている Taxol® の 30 mg/5 mL を生理食塩水で希釈し、0.3 mg/800 μ L とした。皮下注射は一週間に一度行い、0.3 mg/800 μ L を 100 μ L (37.5 μ g)を注射した。注射時は皮下腫瘍の局所に注射し、ファイバーは切開し皮下腫瘍の上に移植した。全てのグループについて、実験開始前に切開して腫瘍サイズを計測し、縫合した。二カ月間の治療後、再び切開して腫瘍サイズを計測した。

4-3 実験結果

4-3-1 Poly(N-isopropylacrylamide-*co*-hydroxymethylacrylamide)の合成と構造評価

NIPAAm の相転移温度をより高温側へ制御するため、HMAAm との共重合を行った。HMAAm を共重合させる高分子として選択した理由は、OH 基を有しており NIPAAm と共重合することで相転移温度を高温側へ制御可能であることに加え、後の熱架橋反応に応用するためである。HMAAm 導入量を 0, 10, 20, 30, 40%(NIPAAm, NIPAAm-HMAAm(20), NIPAAm-HMAAm(30), NIPAAm-HMAAm(40))とした共重合体を作製し、相転移温度を UV-Vis の濁度変化により決定した。

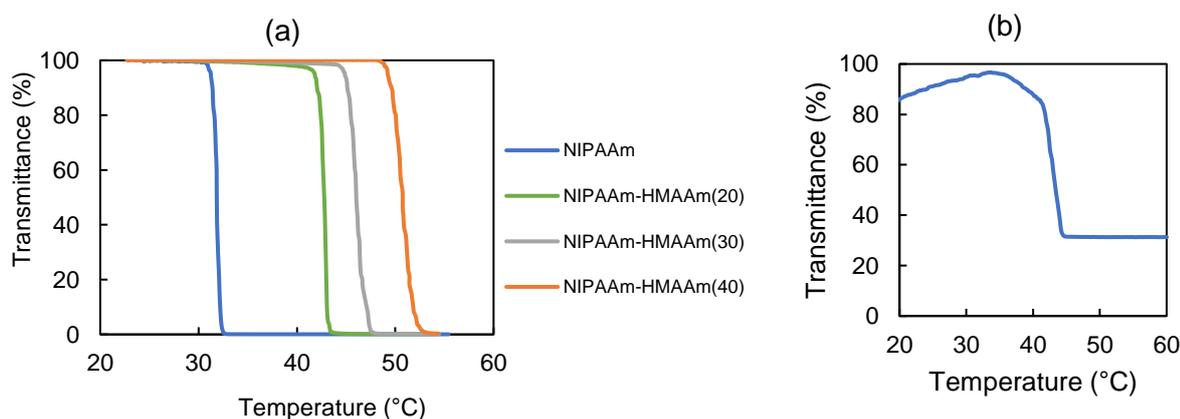


Figure 4-1. (a) Poly(NIPAAm-*co*-HMAAm)の HMAAm 導入量を変化させた際の相転移温度の違いを示したグラフ(b)HMAAm 導入量 20%の共重合体から作製したファイバーの濁度変化を示したグラフ。

HMAAm 導入量に依存した相転移温度の変化を、Figure 4-1(a)に示す。HMAAm 導入量が増加すると、相転移温度も高温側へシフトしていることが分かる。本章の目的である温熱との併用において、43°Cで相転移を生じる 20 mol%の HMAAm 導入量が適しているため、今後の評価に 20 mol%の共重合体を使用した。20%HMAAm を導入した共重合体から作製したファイバーの濁度変化のグラフを Figure 4-1(b)に示す。ポ

リマー溶液の結果と同様に、約 43°C 付近で相転移が生じており、ファイバー化しても相転移温度には影響しないことが分かった。

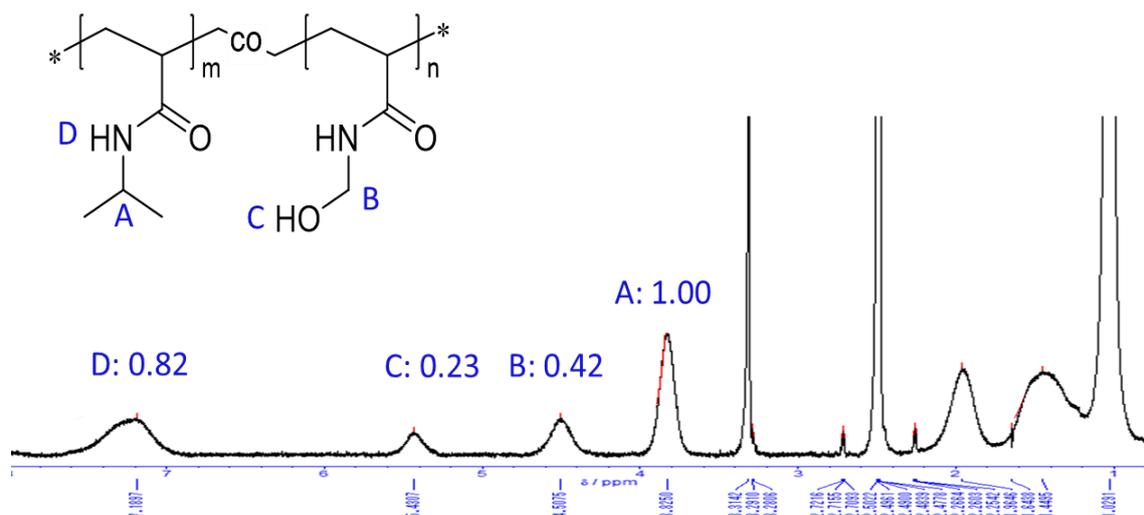


Figure 4-2. Poly(NIPAAm-co-HMAAm) (HMAAm 20 mol%)の¹H-NMR スペクトル

Figure 4-2より、20 mol%の HMAAm を導入した共重合体の¹H-NMR スペクトルのピークと積分値の同定が可能であった。ピーク比より、導入量 20%の場合で、21 mol%の HMAAm が導入されていることを確認した。また、合成した Poly(NIPAAm-co-HMAAm)の分子量を GPC(THF)で測定した。結果を Table 4-2 に示す。分子量が 50k の共重合体の合成に成功した。分子量は電界紡糸するためには一定以上の値である必要があり(5章で記述)、50k は電界紡糸するに適している。

Table 2-2 Poly(NIPAAm-co-HMAA)の GPC 結果

Feed (mol%)		Contents (mol%) ¹⁾		Mn ²⁾	Mw ²⁾	Mw/Mn ²⁾
NIPAAm	HMAAm	NIPAAm	HMAAm			
80	20	79	21	4.99 x 10 ⁴	1.39 x 10 ⁵	2.78

1) Measured by ¹H NMR.

2) Measured by GPC.

4-3-2 作製したナノファイバーの構造評価

電界紡糸で作製したナノファイバーの構造について評価した(Figure 4-3)。

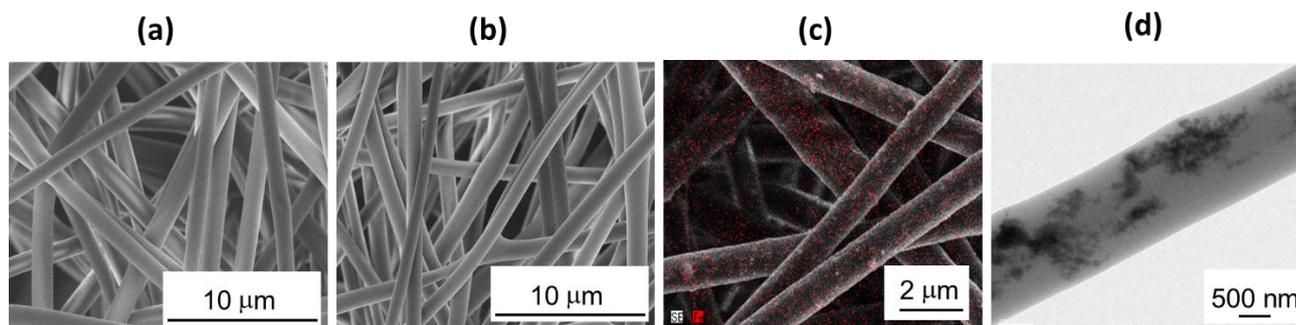


Figure 4-3. 作製した MNP/PTX_NF の画像(a)電界紡糸後のナノファイバーの SEM 画像 (b)熱架橋後のナノファイバーの SEM 画像 (c) EDX マッピング(Fe:赤ドット) (d) TEM 観察画像

熱架橋のための 130°Cの加熱は、ファイバー構造に影響しないことが分かった(Figure 4-3 (a), (b))。さらに Figure 4-2 (c)および(d)では、前章の Figure 3-2 でも観察されたように、MNPs がファイバー径全体に分散している様子が確認された。Figure 4-2 (c)では、MNPs の鉄元素の存在が赤いドットで示されている。鉄元素がこの画像全体に分布しているため、ファイバー径全体に Fe が分布していることが分かる。Figure 4-2 (d)では、ファイバー一本中に存在している MNPs 粒子の様子を示している。この写真から、ファイバー一本中には、MNPs が局在していないことが観察された。実際に、MNPs を過剰量内包したファイバーを観察した画像を Figure 4-4 に示した。このファイバーは MNPs を二倍量(24 mg, 60 w/w%)加えて電界紡糸している。明らかにファイバー内に凝集塊が作製されており、局在している凝集塊により部分的にファイバー膨らんでいるような様子が観察された。このようなファイバー系全体に対して不均一な MNPs の分布は、AMF による発熱挙動に影響すると考えられる。

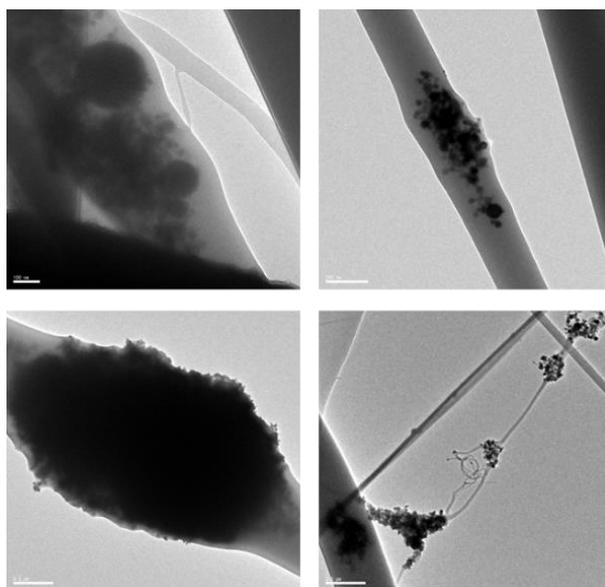


Figure 4-3. MNPs を 60w/w 内包したナノファイバーの TEM 観察画像

4-3-3 ナノファイバーの熱架橋評価

ナノファイバーの架橋について、FT-IR で評価した。130°C加熱を 0 から最大 72 時間で行い、ファイバーのメチロール基(1140 のピーク)が減少していることを確認することで、架橋の有無を判断した。結果を Figure 4-4 に示す。メチロール基のピークは、熱架橋 24 時間後からほとんど検出されなかった。これより、熱架橋は 130°C で 24 時間に行うこととした。

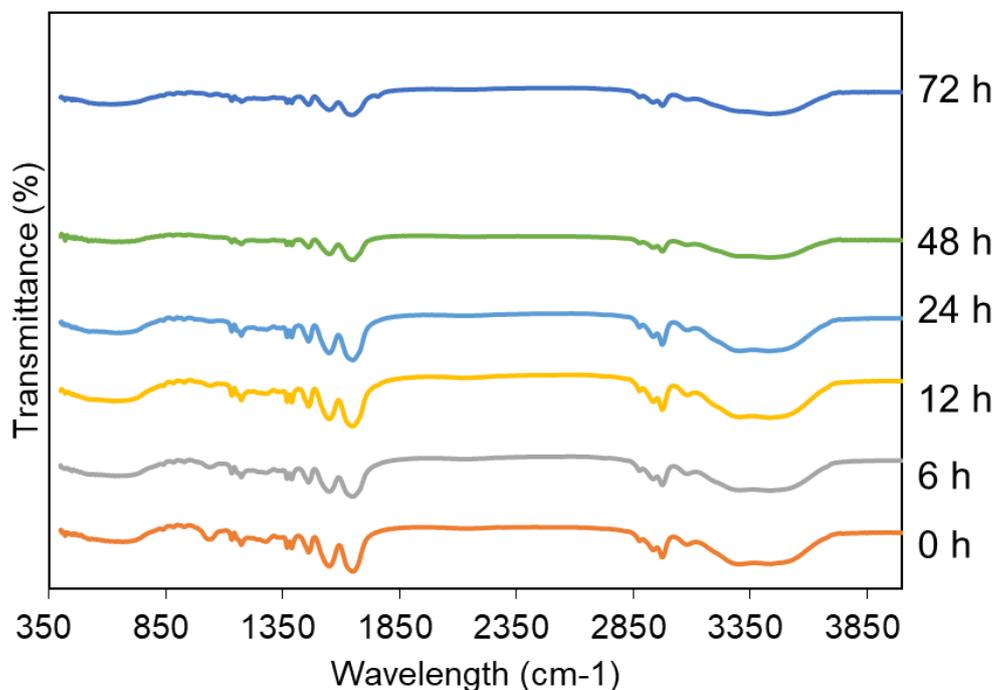


Figure 4-4. 熱架橋(0-72 時間)後のナノファイバーの FT-IR データ

4-3-4 ナノファイバーの膨潤・収縮挙動評価

ナノファイバーの温度応答性能について、AFM により解析を行った。最初、ナノファイバーは空気中で観察し、その後水を加えて膨潤させた。さらに水中温度を上昇させることで、ファイバー径の変化を観察した。また、同様にして水を含んだナノファイバーの重量変化も測定した。

結果として、相転移温度以下である室温水中において poly(NIPAAm-co-HMAAm)は親水性であるために膨潤した。ファイバー径は、この時大気中の時と比較して 2.7 倍増加した(0.83 μm から 2.2 μm)。その後、相転移温度以上への温度上昇により、ファイバー径は 2.2 μm から 1.4 μm へ 1.6 倍収縮した(Figure 4-5 (b))。重量については、水中室温で膨潤させると 4.3 mg から 24.0 mg となり、水を約 20 mg 吸収した。温度が相転移温度以上に上昇すると、重量は 8.0 mg となり、吸収した 20 mg のうち 16.3 mg を脱水したこれは、吸収した水の 82%を脱水和により圧搾放出されることを意味する(Figure 4-5(c))。これらの結果は、NIPAAm の温度応答性機能が、ナノファイバー化されても維持できている。

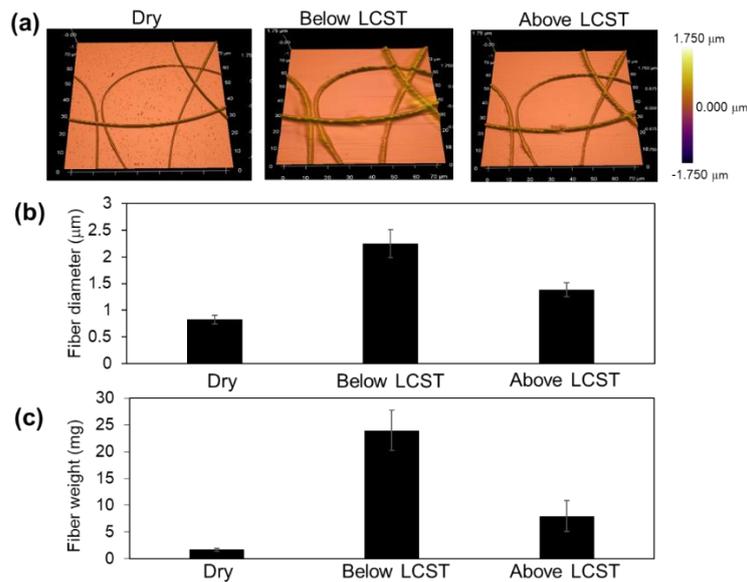


Figure 4-5. (a)AFM で観察した大気中、水中 25℃、水中 50 度のナノファイバーの画像 (b)得られた AFM 画像から計測されたファイバー径変化 (c)大気中、水中 25℃、水中 50℃におけるファイバーの重量を示したグラフ

4-3-5 交流磁場照射時の温熱挙動評価

MNPs_NF に交流磁場を照射し、時間ごとの発熱温度の変化を計測した(Figure4-6)。交流磁場照射後にナノファイバーの温度上昇が観察され、照射後は温度の下降が確認された。最初の 15 分間は交流磁場照射時におけるナノファイバーの発熱温度を示し、15~20 分間は交流磁場照射停止後の温度変化である。交流磁場の照射後、温度は速やかに上昇し、5 分後には 43℃に達した。その後、10 分間にわたり、交流磁場照射中は発熱温度は 40~45℃で一定の温度幅を維持した。交流磁場照射停止後、温度は速やかに下降し、5 分後には交流磁場照射前の温度とほぼ同じ 27℃にまで下降した。

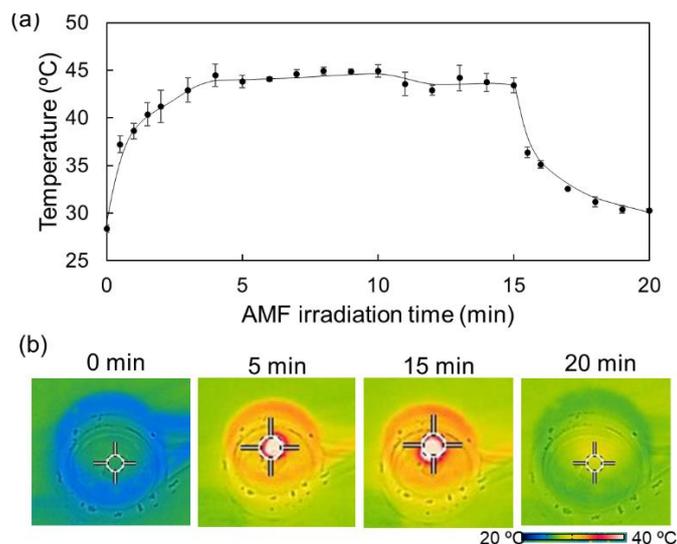


Figure 4-6. MNP_NF の交流磁場に応答した発熱挙動の評価。(a)交流磁場照射後に観察された MNP_NF の温度変化を表したグラフ。15 分交流磁場を照射し、続く 5 分間は交流磁場照射停止後に観察された冷却課程を示す(b) 交流磁場照射後に観察されたサーモカメラの画像

これより、poly(NIPAAm-co-HMAAm)で作製した MNPs_NF は、前章の PCL で作製したナノファイバーと同等の発熱能力を維持できていることが明らかとなった。

4-3-6 薬物放出評価

薬物放出挙動は自然拡散による放出評価(Figure 4-7)と、AFM による発熱で誘導される放出の評価(Figure 4-8)の試験を行った。

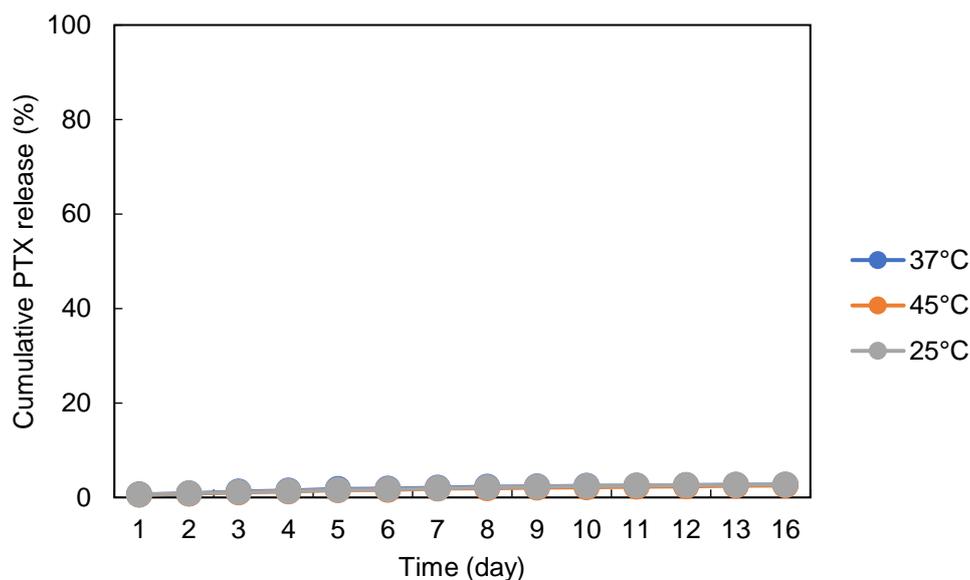


Figure 4-7. MNP/PTX_NF の長期薬物放出試験の累積 PTX 量のグラフ

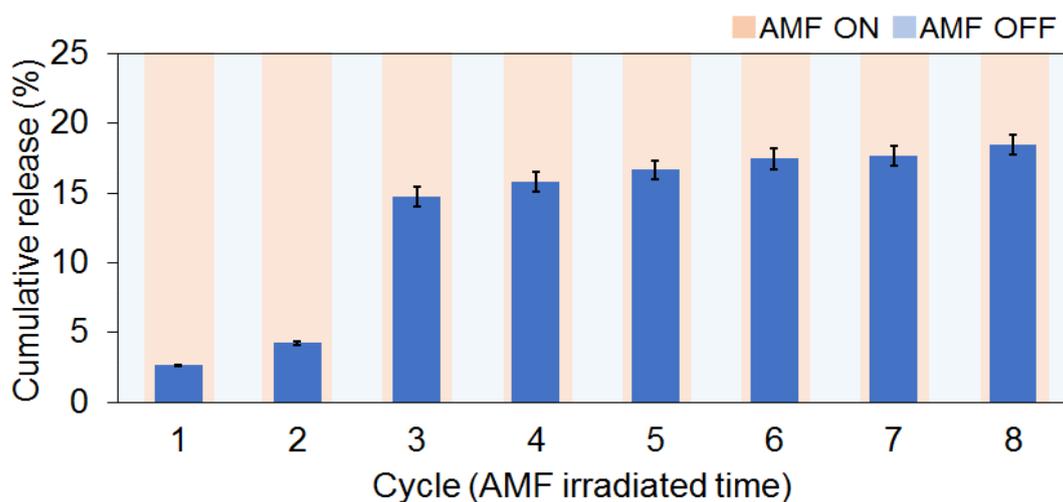


Figure 4-8. MNP/PTX_NF の交流磁場応答により放出された累積 PTX 量を示すグラフ

Figure 4-7 より、室温、37°C、43°C で PTX の放出試験を行ったが、ほとんど PTX の放出は生じなかった。(16 日目で約 3% の放出)。Figure 4-8 に、水で膨潤したナノファイバーから AFM 照射時に圧搾放出された水に含まれる PTX 量を示す。この結果では、8 回の交流磁場照射で内包量の約 18% (54 μ g) の PTX が放出されることを示している。一回目の照射では 2.6% (8 μ g) が放出され、3 回目以降は平均 0.8% (約 2 μ g) の PTX が

放出された。3回目の照射時においては、PTX 内包量の 11%(33 μ g)の最も多い放出を示した。この理由として、まずこのファイバーからの PTX の放出はファイバーの脱水に伴う収縮によって生じる。そのため、膨潤と収縮を繰り返すことにより、ファイバー内の薬物濃度が減少して放出量が減少していくことは理にかなっている。また、Figure 4-5 で示したように、膨潤したファイバーから放出される水は、81%であり、残りの 19%は放出されない。そのため、ファイバー内から水中へ放出された PTX がファイバー構造にトラップされ、2回目もしくは3回目の AMF 照射による収縮で放出されていることは十分考えられる。

4-3-7 ナノファイバーを用いた *in vitro* 抗腫瘍評価

AMF に応答して放出される PTX の放出と温熱の併用効果について検討を行った。細胞は NCI-H23 を使用した。MNP/PTX と比較するため、内包無ナノファイバー(Fiber only)、MNPs 内包ナノファイバー(MNP only)、MNP および PTX 内包ナノファイバー(MNP/PTX)、control、AMF 照射のみの群で比較した。

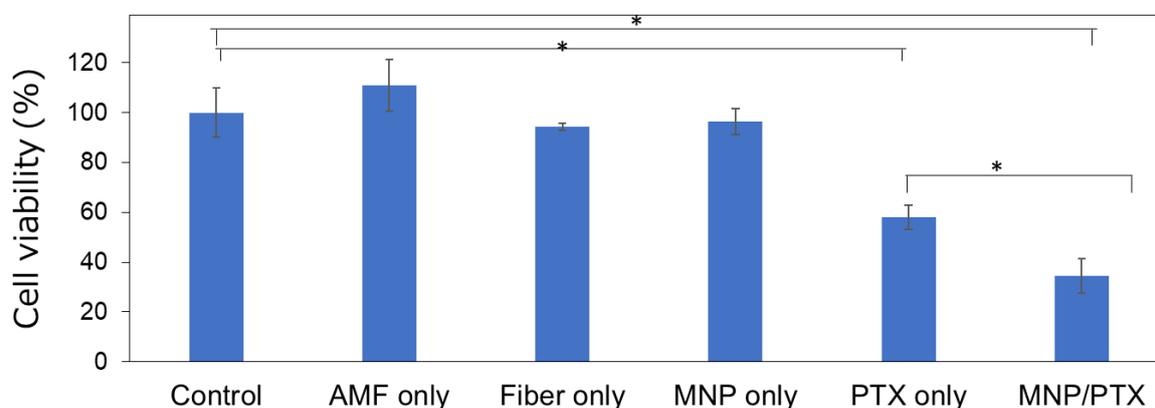


Figure 4-9. *In vitro* の各種サンプルの殺細胞効果 (Control, AMF only : AMF 照射、Fiber only : MNPs および PTX 内包なしナノファイバー、MNP only : MNPs 内包ナノファイバー、PTX only : PTX 内包ナノファイバー、MNP/PTX : MNP および PTX 内包ナノファイバー)

結果より、control, AMF only, MNP only, Fiber only については、細胞生存率は 90%以上の値を示し、ほとんど毒性を示さなかった。これは、AMF, Fiber が毒性を示さないことを意味する。さらに、MNP only でも効果が見られないことから、このファイバーにおいては、dish 内の発熱が 45°Cに達していない可能性が考えられる。一方で、PTX only では殺細胞効果が 40%見られた。この結果は、ナノファイバーから PTX が放出されてこのような結果が見られたと考えられる。一方、MNP/PTX は 65%の殺細胞効果を示した。また、MNP/PTX は AMF 照射により生じた発熱により、圧搾放出された PTX より、優位に作用すると考えられる。

4-3-8 動物実験評価

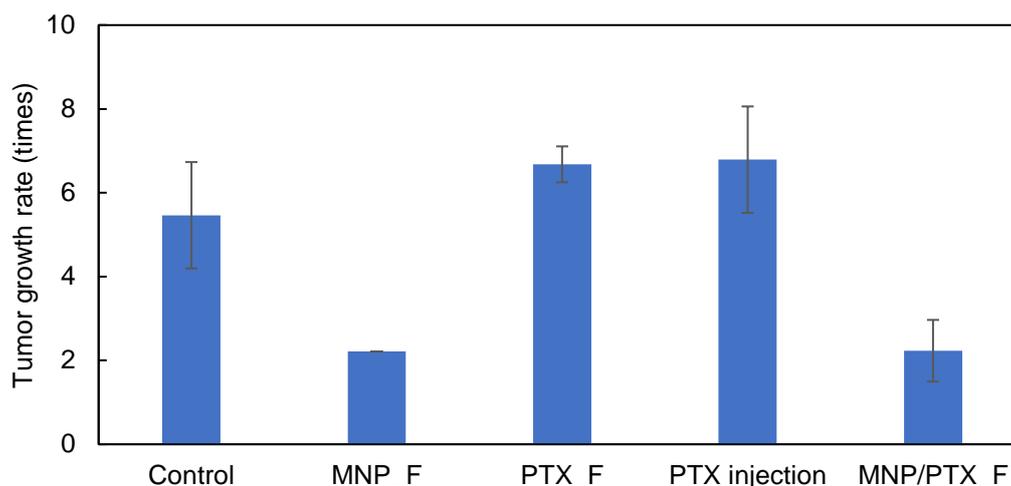


Figure 4-10. 実験開始 2 か月後の各グループの腫瘍サイズ変化を表したグラフ

Poly(NIPAAm-co-HMAAm)の薬物放出挙動について、ON-OFF 薬物放出による効果を評価した。結果は Figure 4-10 に示す。Figure 4-10 にあるように、腫瘍成長は Control, PTX_F, PTX_injection においてほぼ同等の約 6 倍の腫瘍成長を示した。一方で MNP/PTX_F および MNP_F はほぼ同程度の腫瘍成長の阻害効果を示した。MNP/PTX により恐らく PTX の圧搾放出が行われていると考えられ、PTX_F より優位に作用したと考えられる。一方で、MNP_F の効果については、温熱が優位に作用したということの他、免疫系が活性化されたことが考えられる。

4-4 結言

前章では温熱と徐放の併用による効果の増強を達成した、本章では温熱をトリガーとして薬物放出を行うことを目的とした。ON-OFF 放出のために、温度応答性高分子の NIPAAm に着目した。MNP の AMF に応答した発熱を利用し、外部からの交流磁場照射に応答した発熱および薬物放出制御を目的とした。

前章と同様に交流磁場に応答した発熱挙動の制御が可能であり、さらに交流磁場に応答して薬物放出が可能であった。In vitro では AMF に応答した発熱により圧搾された PTX により、抗腫瘍効果が見られたと考えられる。In vivo では、MNP/PTX_NF による抗腫瘍効果が PTX_NF や control と比較して現れた。これは、恐らく In vivo でも PTX の圧搾放出が可能であることが考えられる。一方で、MNP_NF も PTX/MNP_NF と同等の抗腫瘍効果が見られた。これは、明確な原因は検討中であるが、恐らく温熱による免疫系の発現や PTX/MNP_NF の PTX が in vivo では早く完了してしまった可能性も考えられる。

本章において温熱に応答して PTX を ON-OFF 放出可能なナノファイバーの設計を行った。AMF に応答した発熱およびそれに伴う PTX 放出が可能であった。In vivo の結果からは、PTX の MNP の発熱に応答した放出による効果は明確には見られなかったが、今度ナノファイバーの架橋度や力学的性質の向上などより精密にナノファイバー設計を行うことで達成できる。

参考文献

1. Mormont, M. C.; Levi, F., Cancer chronotherapy: principles, applications, and perspectives. *Cancer* **2003**, *97*(1), 155-69.
2. Schild, H. G., Poly(*N*-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Prog. Polym. Sci.* **1992**, *17*, 163-249.

第5章 ナノファイバーの生分解性制御

5-1 緒言

本章では、体内移植デバイスに重要となる分解性を制御するナノファイバーの設計について述べる。PCLの分解性は、通常2-4年かかることが報告されている¹⁻²。治療期間が終了した後、移植した材料が無意味に体内に留まり続けることは避けるべきことである³⁻⁵。これまでに報告されている生分解性制御を目的とした材料は、異なる材料をブレンドして電界紡糸している⁶。その理由として、電界紡糸するには、ポリマー溶液が一定の粘度でないとファイバー構造の作製が非常に困難である。そのため、例えばPCLのみを用いた電界紡糸ファイバーの作製においては、45k以上の分子量を使用してファイバーが作製されている。PCLのような生分解性高分子は、基本的には分子量が低いほど、その分解時間は早くなるが、例えば2kのような低分子では電界紡糸は困難である。本章では、新たな試みとし、異種ブレンドの電界紡糸ナノファイバーでなく、同種PCLをブレンドした電界紡糸ナノファイバーを作製し、その分解性および物性を検討した。本章の目的として、生分解性を制御するナノファイバーの設計を行い、分解性に関わると考えられる親水性評価や分子量変化について評価した。

5-2 実験方法

5-2-1 実験試薬

本章で使用した試薬リストを下記に示す

Table 5-1 5章で使用した試薬リスト

Reagent	Abbreviations	Company	Location
1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol	HFIP	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PBS	nakalai tesque	Kyoto, Japan
Polycaprolactone average Mn 80,000	80k PCL	Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
Polycaprolactone diol average Mn ~2,000	2k PCL	Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
Sodium Hydroxide	NaOH	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan

5-2-2 ファイバーとフィルムの作製方法および構造評価方法

(1)分子量の異なるPCLを混合したキャストフィルムの作製方法

分子量の異なる同種PCLをブレンドしたナノファイバーと比較するため、ブレンド溶液からキャストフィルムを作製した。分子量が80kのPCL(80k PCL)と2kのPCL(2k PCL)をそれぞれ下記のtableに示す割合で混合し、HFIP溶液に攪拌して溶解した。合計PCL溶液濃度が10wt/v%となるようにHFIPを加えた。その後、溶液を10cm dishに8 mL入れ、ドラフト中に4日間室温で静置させて乾燥した。完全に溶液が揮発していることを確認した後、10 cm dishからキャストフィルムを剥がし、次項の実験に使用した。

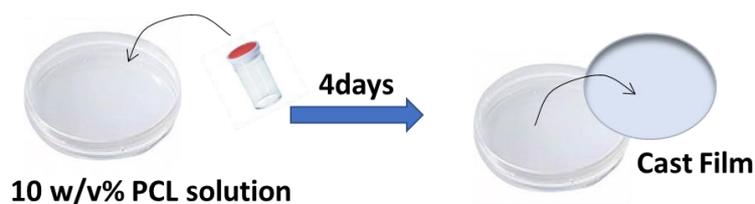


Figure 5-1. キャストフィルムの作製方法

Table 5-2. キャストフィルムの作製条件

80 k PCL mg (wt%)	2k PCL mg (wt%)	HFIP μL
603.7 (100)	0 (0)	604
456.6 (75)	155.3 (25)	612
392.7 (67)	193.1 (33)	586
296.3 (50)	298.2 (50)	595
155.3 (25)	456.6 (75)	612
120.0 (20)	480.0 (80)	600
0	606 (100)	606

(2)ブレンドナノファイバーの作製方法

下記の表に示す条件で、ブレンドナノファイバーの電界紡糸条件の検討を行った。下記の表のポリマーおよびブレンドポリマーについて電界紡糸条件の検討を行った。

Table 5-3. ブレンドナノファイバーの電界紡糸を検討した条件の一覧

Sample (solvent)	Conc. (wt%)	Voltage (kV)	Flow (mL/h)	Gap (cm)
10k PCL (TFE, HFIP)	7, 30, 50	10, 20, 30	0.5, 0.8, 1.0, 1.25, 1.5	15
45k PCL (HFIP)	7	10, 20, 30	0.5, 1.0	13
80k PCL (HFIP)	7, 5	10, 20, 30	0.5, 1.0	13
10k : 80k (9:1, 7:3, 5:5) (TFE)	7, 30	30	1.0	15
2k : 10k (TFE)	30	10, 20, 30	0.5, 1.0	13
2k : 80k (9:1, 5:5, 6.7: 3.3) (TFE, HFIP)	50, 15, 10	10, 20, 30	0.5, 1.0	13
45k : 80k (5:5) (HFIP)	7	10, 20, 30	0.50, 1.0	13

5-2-3 DSC 測定方法

5-2-2 で作製したキャストフィルムおよびファイバーの融点を DSC にて測定した。アルミパンの中に入るように細かくカットしたサンプルを 5 mg 入れた。サンプルシーラーでシールし、サンプルの DSC を 5°C/min で 0°C-120°C の温度範囲で測定した。

5-2-4 接触角測定方法

5-2-2 で作製したフィルムを約 1cm 角に切り取り、ステージ上にセロテープで固定した。その後、接触角測定装置に設置されているシリンジから蒸留水 1 μ L をサンプル表面に滴下した。滴下した直後、画像を保存し、サンプル表面に対する接触角を測定した。ファイバーの接触角は、電界紡糸を 5-2-2 の条件で行う際、ステージ上にカバーガラスを置き、ガラス上に直接ファイバーを噴射して作製した。37°C のオーブンにいれて電界紡糸に使用した溶媒を揮発させ、室温に 6 時間放置して PCL を完全に結晶化させた後、フィルムと同様の方法で接触角を測定した。

5-2-5 分解性試験方法

分解性試験は、3N NaOHaq 中に行った。2k:80k のブレンドファイバーを 25 mm のディスク状にカットし、その重さを測定した。その後、5 mL の NaOHaq を添加した 6 mm dish にファイバーサンプルをそれぞれ入れた。その後、3 時間ごとにファイバーを取り出してキムワイプで水を軽く拭き、重量変化を測定した。

5-3 実験結果

5-3-1 ブレンド PCL のキャストフィルムおよびファイバーの構造評価

(1)キャストフィルム

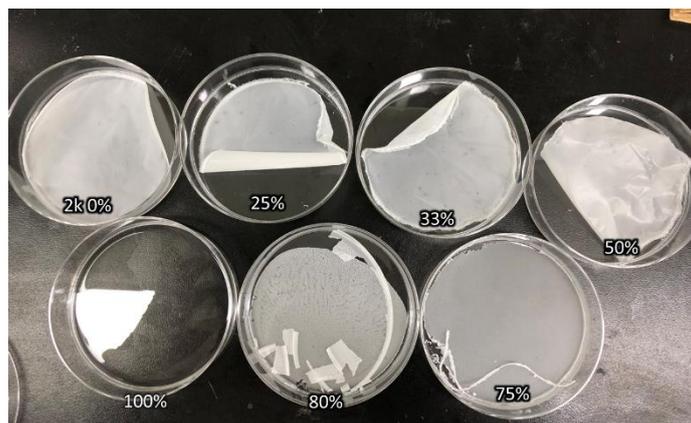


Figure 5-2. 作製したキャストフィルムの画像

4 日間ドラフト内で乾燥して作製したキャストフィルムの画像を Figure 5-2 に示す。フィルムは 2k が 75% 以上では、dish から剥がすことが不可能であった。また、2k100% の場合においては、HFIP が殆ど揮発しているにも関わらず溶液状態で、フィルムを形成しなかった。これより、以下の実験ではキャストフィルムは 2k が 50% 以上のものを使用した。

(2)ブレンドファイバー

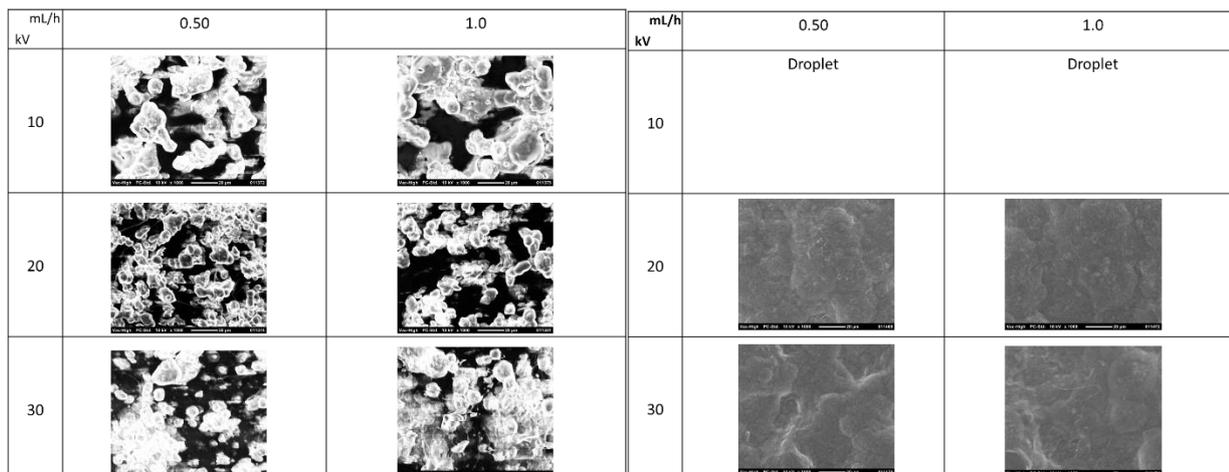


Figure 5-3. (左)PCL 10k 50wt%の電界紡糸した際の構造観察画像。(右)2k : 10k (85:15) 30wt%溶液の電界紡糸した際の構造観察。

まず、低分子量である 10k 単体でのファイバーの電界紡糸について検討した。Figure 5-3 に示すように、ファイバーや粒子の構造の形成は不可能であった。さらに 2k と 10k を混合することで、混合した溶液の分子量の分布が広くことによる影響を観察したが、分子量が低いために液滴が 10kV で観察された。また、一見粒子状に噴射されているように見受けられた 20kV や 30kV の条件では、HFIP 溶液が揮発せずにステージに捕集されてしまったがためにフィルムのような構造をしめた。

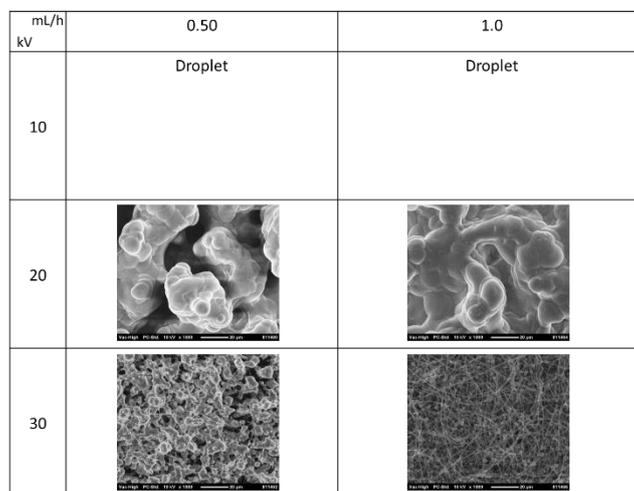


Figure 5-4. 2k: 80k (9:1)のブレンドで電界紡糸した構造観察写真

Figure 5-4 に、2k:80k (9:1)のブレンドによるファイバー作製条件検討を行った。興味深いことに、流量 1.0 mL/h で 30kV においてファイバー構造の形成が確認された。しかしながら、このファイバーをアルミホイルから剥がそうとすると、蠟のようにもろく、アルミホイル状に薄膜を形成しているような状態であった。これは、電界紡糸課程においてはファイバーを形成するが、2k の割合が非常におおいため、ファイバー自体は 2k PCL に非常に近い物性を有するためである。ファイバー構造を有しているフィルムが作製された。

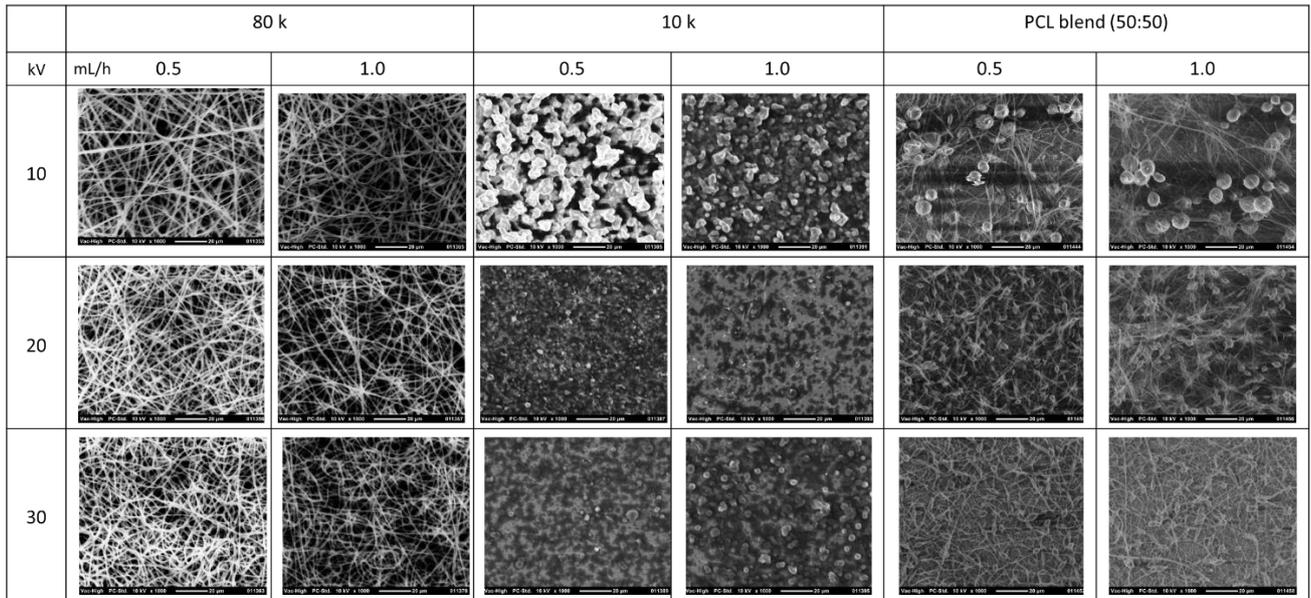


Figure 5-5. 80k PCL, 10k PCL, ブレンド(5:5)のブレンドファイバーの作製条件検討

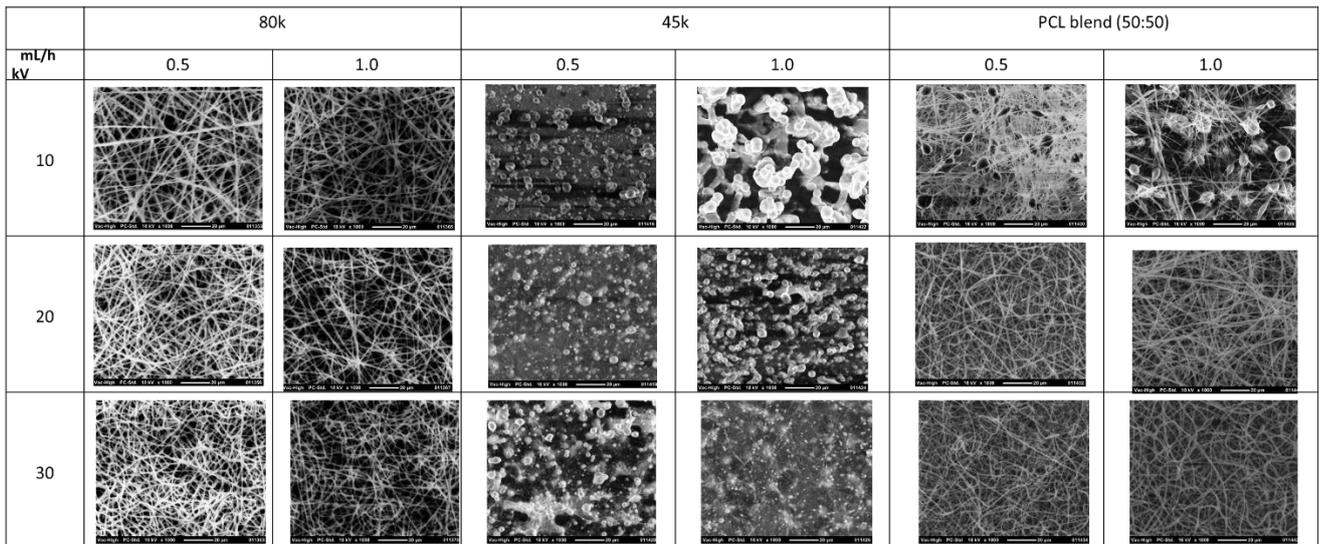


Figure 5-6. 80k PCL, 45k PCL, ブレンドファイバーの作製条件の検討

Figure 5-5 と Figure 5-6 に、80k PCL に対してそれぞれ 45k PCL と 10 k PCL をブレンドした場合の電界紡糸を示す。どちらも 7wt/v%溶液で電界紡糸をしているが、この濃度においては 80k はファイバー構造を作製可能である。45k および 10 k PCL は、どちらも粒子の形成が確認された。この条件において、合計 7 wt/v%のポリマー濃度となるよう、5:5 の割合で 80k に対して 45k もしくは 10k を混合し、電界紡糸を行った。どちらのブレンドポリマーにおいても、ファイバー構造の形成が確認された。10k のブレンドファイバーにおいては、若干のビーズが存在していた。これは 10k の短鎖である PCL から生じていると考えられる。一方で、45k とのブレンドファイバーにおいては、電圧 20kV 以上では均一なファイバー構造が形成された。

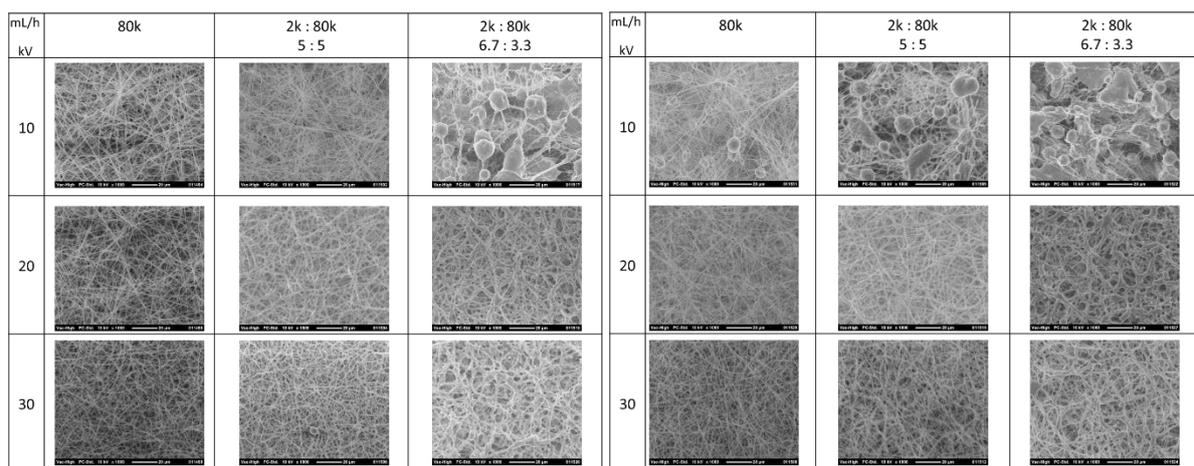


Figure 5-7. 80 k および 2k のそれぞれのブレンドした溶液から作製されたファイバー構造の SEM 画像(左) 流量 0.5 mL/h, (右)流量 1.0 mL/h

80k に低分子量である 45k や 10k PCL とのブレンドにより、ファイバー構造が作製できることが明らかとなったため、より低分子量の 2k の PCL とのブレンドを試みた。80k と 2k のブレンド比を二種類(5:5、6.7:3.3)で電界紡糸を行った。Figure 5-7 に示すように、電圧が 20 kV 以上においてファイバー構造がどのサンプル群でも確認できた。2k のブレンド比が増加する毎に、ファイバー径が増加する傾向が見られた。また、2k 比が増加するほど、作製したナノファイバーに光沢が見られた。

5-3-2 DSC 測定

2k-0, 25, 33, 50 フィルム、2k-0, 2k-33, 2k-50, 2k-67, 2k-75 ファイバー、市販の 80k PCL および 2k PCL について DSC の測定を行った。ファイバーにおいても、フィルムにおいても、2k のブレンド量が増加するにつれて、極大ピークが低温度にシフトする傾向が見られた。これは、作製したフィルムやファイバー中に、2k が混合できていることを示す。

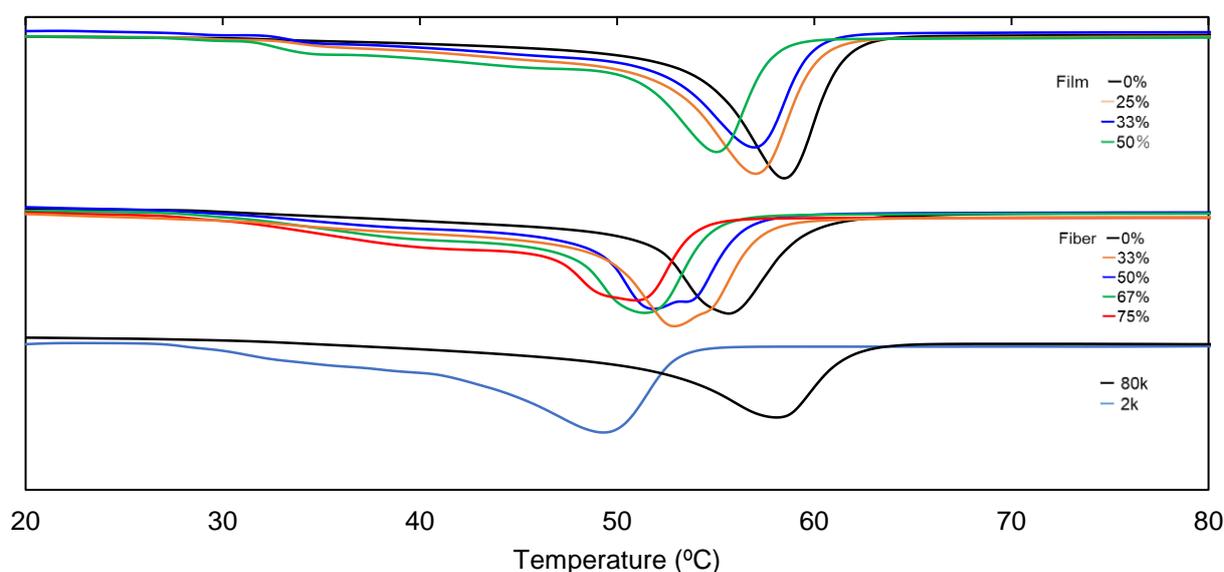


Figure 5-8. 2k PCL をブレンドしたファイバーとフィルムの DSC

5-3-3 接触角試験結果

2k をブレンドしたファイバー表面に水滴を滴下すると染み込む挙動が観察されたため、接触角を測定した。表面親水性の変化は、生分解性に影響を及ぼす重要な要因である。

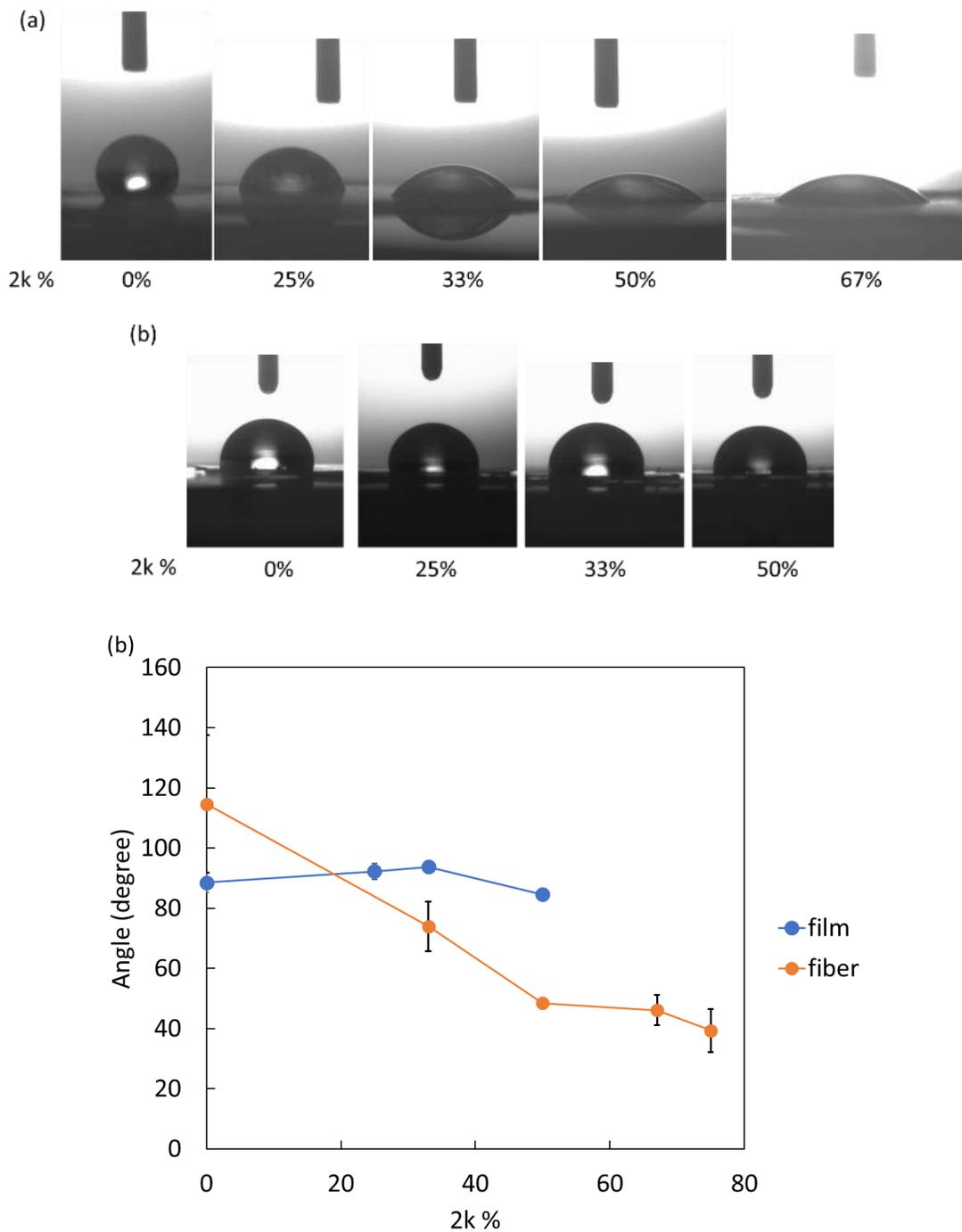


Figure 5-9. (a)2k を 0-67%の割合で 80k PCL と混合して作製したファイバーの接触角観察画像。(b)2k を 0-50%の割合で 80k PCL と混同してキャストしたフィルムの接触角観察画像。(c)得られたブレンドファイバーとフィルムの接触角を示したグラフ

ブレンドファイバーの接触角試験の結果は、2k PCL 量の増加に依存して、表面濡れ性が顕著に増加することを示していた(Figure 5-9 (a), (c))。一方で、フィルム表面はその表面濡れ性は 2k の割合が変化してもほ

とんど差はなかった(Figure 5-9 (b), (c))。この結果の意味するところは、2kが増加することにより材料表面に2k末端のOH基が露出する頻度が増加していることが考えられる。また、ファイバーは空隙があるので、材料表面の僅かな親水性変化により接触した水を空隙へ吸い込まれるためと考えられる。これより、フィルムや80kファイバーと比較して、2kのブレンドは水と接する表面積の増加をもたらし、生分解性を短期化すると考えられる

5-3-4 分解性試験結果

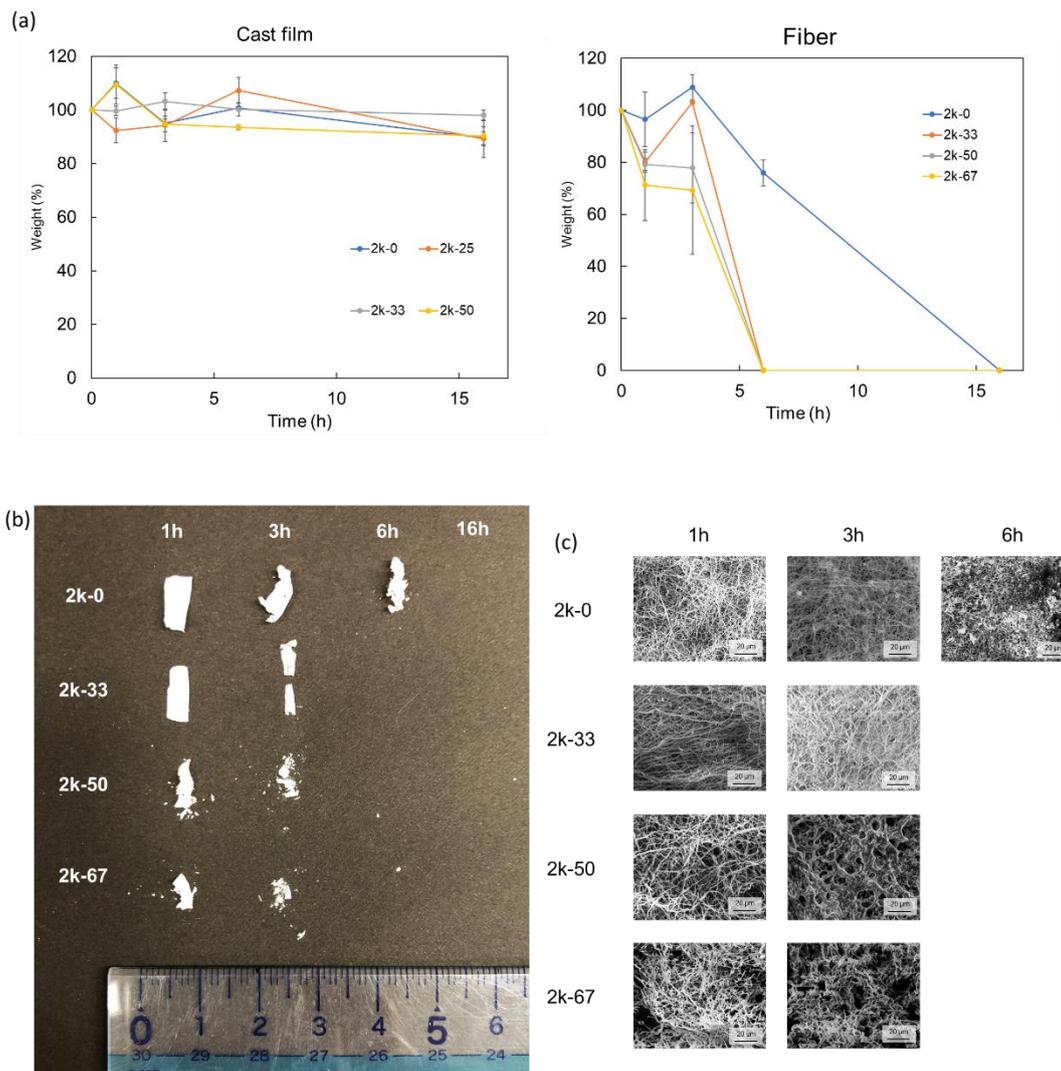


Figure 5-10. 各ファイバーおよびフィルムを用いた分解性試験結果 (a)フィルムおよびファイバーの重量変化 (b) 時間経過後の各ファイバーの画像と(c)SEM画像

3N NaOHaqの分解性試験の結果を Figure 5-9 に示す。分解性試験は、2k-0, 2k-25, 2k-33, 2k-50 のブレンドフィルムと、2k-0, 2k-33, 2k-50, 2k-67 のブレンドファイバーで行った。この実験では、6時間後には2kをブレンドしたファイバーはほとんど分解された。2k-0ファイバーはこの時点では残留していたが、16時間後には分解された。ファイバーのSEM観察から、3時間後の2k-50および2k-67ファイバーにおいて表面から構造が崩壊している様子が確認できる。一方で、フィルムにおいては、この時間スケジュールでは

どれもほとんど分解されなかった。これらの結果は、Figure 5-8 で得られた接触角試験の結果から、2k PCL をブレンドしたファイバーにおいては、積極的な水取り込みが行われ、分解が加速されたと考えられる。一方で 2k-0 ファイバーは、2k-33, 2k-50, 2k-67 ファイバーほど分解時間は早くはないが、フィルムよりも顕著に疎水性を示していたにも関わらず、フィルムよりも加速された分解を示した。これは、短時間であればファイバーの表面粗さと PCL 本来の疎水性により撥水するが、溶液に長時間暴露されているために空隙に水が入り込み結果的に加速されたと考えられる。また、厚みのあるファイバーでは、より水の浸透に時間がかかると予想される。

5-4 結言

本章においては、通常 2-4 年といわれている PCL の分解期間を早めるため、低分子量の PCL を用いたファイバーの作製方法を模索した。10k 以下の分子量のみを用いた電界紡糸は不可能であったが、より高い分子量の PCL とブレンドすることで、ファイバー構造を作製することが可能であった。また、ブレンドする割合が多い PCL の物性を示した。さらに、ブレンドすることでその分解期間と表面濡れ性を変えることが可能であった。

参考文献

1. Sajkiewicz, P.; Heljak, M.K.; Gradys, A.; Choińska, E.; Rumiński, S.; Jaroszewicz, T.; Bissenik, I.; Świążkowski, W. Degradation and related changes in supermolecular structure of poly(caprolactone) in vivo conditions. *Polym. Degrad. Stabil.* **2018**, *157*, 70-79.
2. Boomer, L.; Liu, Y.; Mahler, N.; Johnson, J.; Zak, K.; Nelson, T.; Lannutti, J.; Besner, G.E. Scaffolding for challenging environments: materials selection for tissue engineered intestine. *J Biomed Mater Res A* **2014**, *102(11)*, 3795-3802.
3. Huang, M.; Li, S.; Hutmacher, D.W.; Coudane, J.; Vert, M., Degradation characteristics of poly(ϵ -caprolactone)-based copolymers and blends. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, *102(2)*, 1681-1687.
4. Hutmacher, D.W. ; Schantz, T.; Zein, I.; Ng, K.W.; Teoh, S.H.; Tan K.C., Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res* **2000**, 203-216.
5. Hutmacher, D.W., Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* **2001**, *12*, 107-124.
6. Cipitria, A.; Skelton, A.; Dargaville, T.R.; Dalton, P.D.; Hutmacher, D.W., Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review. *journal of materials chemistry* **2011**, *21*, 9319-9453.

第6章 ナノファイバーの形状記憶特性制御

6-1 緒言

本章では、更なる DDS 基材への応用として、形状記憶性能を有するナノファイバーの設計について述べる。生体内組織は複雑な形状を有しており、移植材料の形やサイズとの適合、そして患部との接着性が重要である。特に局所徐放の DDS には、治療期間中の患部への材料の密着が必要である。その解決策として、形状記憶性能に着目した。形状記憶はある温度を境として可逆的に構造を変化可能であり、変形後に熱を加えると変形前の形状に戻る。この機能は、患部の構造に移植したナノファイバーをフィットさせたり、あるいは組織に巻き付けて使用できることが期待できる。

本研究では、このような医療応用の形状記憶ナノファイバー作製の試みとして、PCL の構造中に 1,4-butandiol(BD)と hexamethylene diisocyanate (HDI)からなるハードセグメントを導入し、物理架橋を形成した。

6-2 実験方法

6-2-1 実験試薬

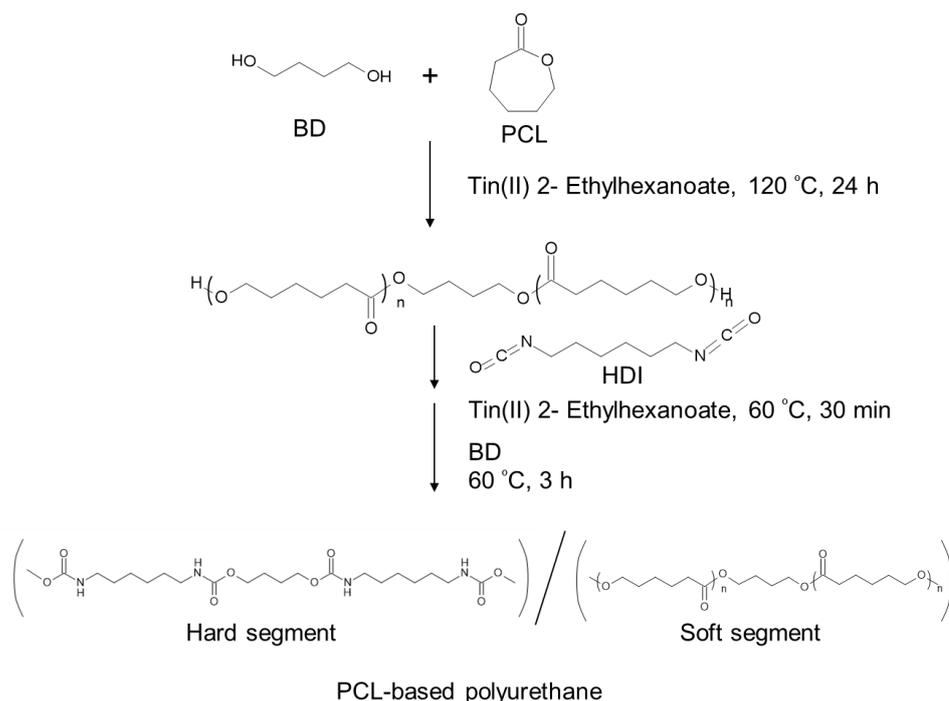
本章で使用した試薬をいかに示す。

Table 6-1 6章で使用した試薬リスト

Reagent	Abbreviations	Company	Location
ε-caprolactone	CL	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Tetrahydrofuran	THF	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
1,4-butandiol	BD	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Tin (II) ethylhexanoate		Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
Diethylether		Sigma-Aldrich Japan	Tokyo, Japan
1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol	HFIP	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Chloroform-d (containing 0.05wt% TMS) 99.6atom%D (stabilized with Silver chip)		Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Dimethylformamide	DMF	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan
Hexamethylene diisocyanate	HDI	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Xylene		FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Osaka, Japan

6-2-2 PCL-based polyurethane の合成方法と構造評価方法

まず、開始剤として 1,4-ブタンジオール (BD), 触媒として 2-エチルヘキサノ酸すず(II)を用いてε-カプロラク톤 (CL)を 120°C, 24 時間反応させ、BD の両側に CL がそれぞれ 100 ユニット重合した 2b-100 の PCL を合成した。さらに、PCL とヘキサメチレンジイソシアネート (HDI), 触媒として 2-エチルヘキサノ酸すず(II)をキシレンに溶解させ 60°C, 30 分攪拌して、末端のヒドロキシ基とイソシアネート基を反応させウレタン結合を有する高分子を合成した。さらに、この溶液に BD を加え 60°C, 3 時間攪拌し鎖延長反応を行った。再沈殿にて精製後、真空乾燥することでニアなポリウレタンを合成した。PCL, HDI, BD の仕込み比は末端基であるヒドロキシ基とイソシアネート基の数が同じになる比を用いた。



Scheme 6-1. PCL polyurethane の合成.

6-2-3 電界紡糸法方法

電界紡糸は、ポリマー濃度 40wt/v%、流量 0.50 mL/h、電圧 25kV、シリンジ針 23G、HFIP 溶液でアルミホイールをコレクターとして電界紡糸を行った。

6-2-4 DSC 測定方法

5-2-2 で作製したキャストフィルムおよびファイバーの融点を DSC にて測定した。アルミパンの中に入るように細かくカットしたサンプルを 5 mg 入れた。サンプルシーラーでシールし、サンプルの DSC を 5°C /min で 0°C-120°C の温度範囲で測定した。

6-2-5 熱安定性試験方法

ハードセグメントとソフトセグメントが異なる PCL polyurethane から作製したナノファイバーを小片にカットし、ガラス dish においた。60°Cのオーブンにそれぞれのサンプルをおいた dish を静置し、24 時間加熱した。その後、取り出したサンプルの構造を SEM で観察した。

6-2-6 形状記憶性能評価方法

PCL-9.2 のファイバーサンプルを 1cm 片にカットした。これを 60°Cの熱水に入れて融点以上に加熱し、延伸した。そのままの状態室温に冷却して形態を固定化させた。その後、再度熱水に入れて融点以上に加熱して形体をもとの状態に戻した。それぞれの形体について、SEM 観察と配向解析を行った。

形状固定化率と形状回復率を、引張試験機を使用して評価した。治具に 2 cm×1 cm にカットしたファイバーをセットし、ドライヤーでサンプルを融点以上に加熱して 200%に延伸した。その後、200%サンプルを延伸させた。治具を固定し、その後 1 時間チャンバー内の温度設定を 4°Cにし、サンプルが完全に結晶化するまで静置した。この時にファイバーが動いた長さを計測し、形状固定化率とした。その後測定をスタートし、チャンバー内の温度を 60°C以上に 30 分かけて加熱し、形状回復率を計算した。さらに、それぞれのファイバーの形状において配向解析を行った(Orientation J)。

6-3 実験結果

6-3-1 PCL-based polyurethane の合成と構造評価

合成した PCL polyurethane は、¹H-NMR および FT-IR より、PCL の合成とウレタン結合の存在を確認した(Figure 6-1, Figure 6-2)。また、それぞれハードセグメントとソフトセグメントの割合を変えて合成した PCL polyurethane の分子量を GPC で同定した(Table 6-2)。

Table 6-2. Characteristic data of a series of PCL-based polyurethanes

Samples	Composition (Molar ratio)	Segment ratio ¹⁾		Segment ratio		Molecular weight ²⁾		PDI ²⁾ (M_w/M_n)
		(Molar ratio)		(w/w%)		M_w	M_n	
		Soft	Hard	Soft	Hard			
PCL	-	-	-	-	-	59,700	46,300	1.29
PCL-6.8	1:3:2	1	5	93.2	6.8	78,900	54,000	1.46
PCL-9.2	1:4:3	1	7	90.8	9.2	73,200	53,000	1.38
PCL-11.3	1:5:4	1	9	88.7	11.3	93,500	68,000	1.37

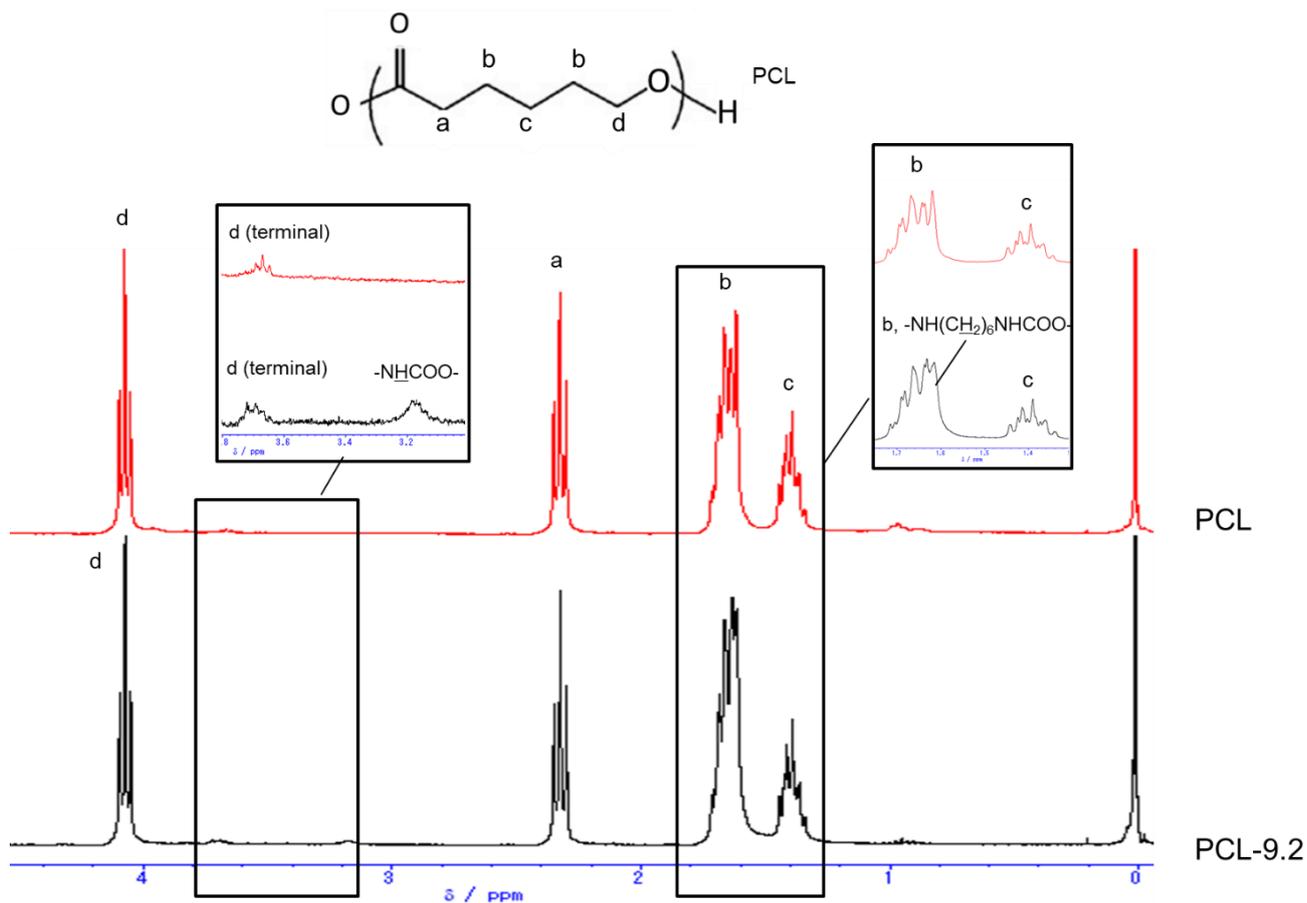


Figure 6-1. 合成した PCL および PCL-9.2 の $^1\text{H-NMR}$ 解析

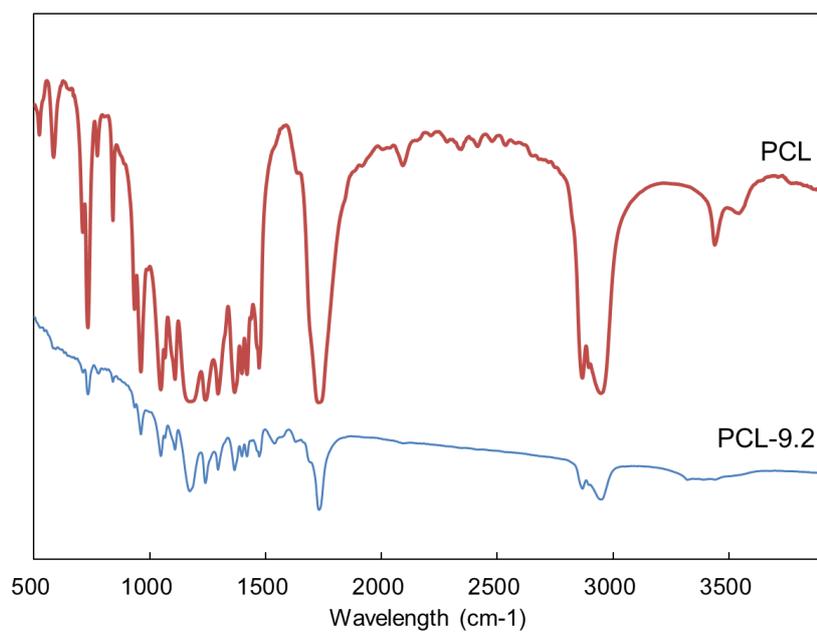


Figure 6-2. 合成した PCL polyurethane の FT-IR による官能基の同定

6-3-2 DSC 測定結果

合成したそれぞれの PCL について、その融点を DSC で測定した。Figure 6-3 に示すように、ハードセグメントを導入した 3 種類の PCL polyurethane は、開環重合して作製した PCL と比較して融点が減少することが確認された。これは架橋が導入されたことに起因する。実際に、ハードセグメント由来と考えられる 140~160°C の範囲の融点が観察された。

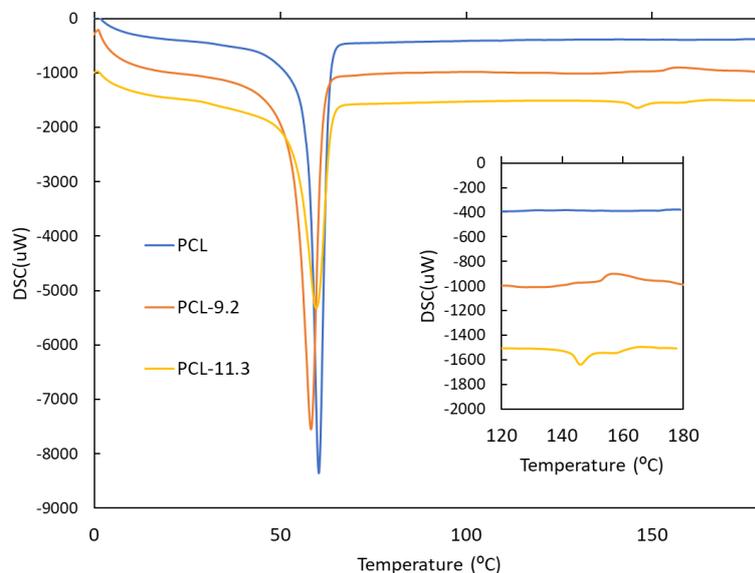


Figure 6-3. PCL、PCL-9.2、PCL-11.3 ファイバーの DSC

6-3-3 熱安定性評価

作製した各 PCL のファイバーの物理架橋を確認するため、融点(60°C)に 24 時間加熱し、その構造を観察した。

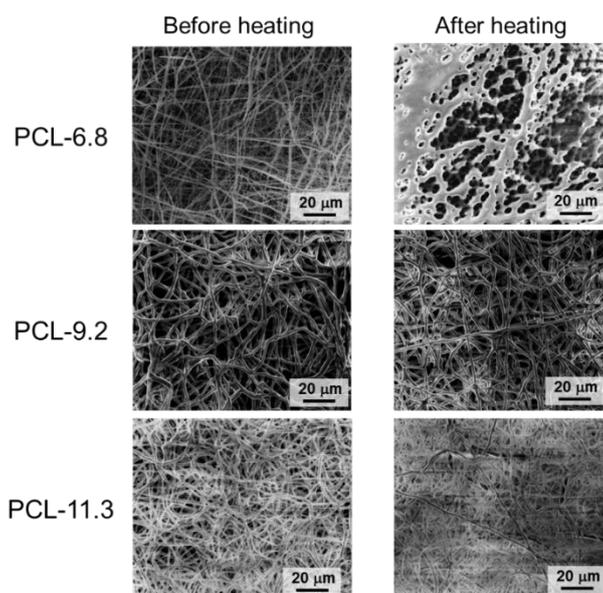


Figure 6-4. 電界紡糸した PCL polyurethane を 60°C で 24 時間加熱した後のファイバー構造

PCL-6.8 は、加熱後に融解している挙動が観察された。これはハードセグメント量が少ないために、架橋密度が低いために生じたと考えられる。PCL-9.2 および PCL-11,3 は、安定したファイバー構造が観察された。

6-3-4 形状記憶性能評価

Figure 6-5 に PCL-9.2 で作製したファイバーの形状記憶性能について評価した結果を示す。PCL-11.3 ファイバーは形状変化させるには脆く、不可能であった。PCL-9.2 のファイバーは融点以上に加熱後、延伸して形状を変化させることが可能であった。その後、再度加熱することで、再び元の形状にへ戻ることが可能であった。それぞれの形状変化後について SEM 観察を行うと、形状変化前はファイバーはランダムに配向しているが、延伸後に一方向に配向していることが分かる。形状記憶後は、ファイバーは再びランダムに配向した。これは Figure 6-4 でより明確に示されており、ファイバーが形状変化後、 90° 配向が変化したことを示している。さらにファイバー径の変化から、この形状変化はファイバー一本単位で行われ、延伸されることによりファイバー径が減少していた。形状回復後、ファイバー径はもとの大きさに戻っていることからわかる。延伸による形状変化は最大 400%で行ったが、形状固定化率および形状回復率のどちらも 90%以上の値を示し、高い形状記憶特性を有しているといえる。

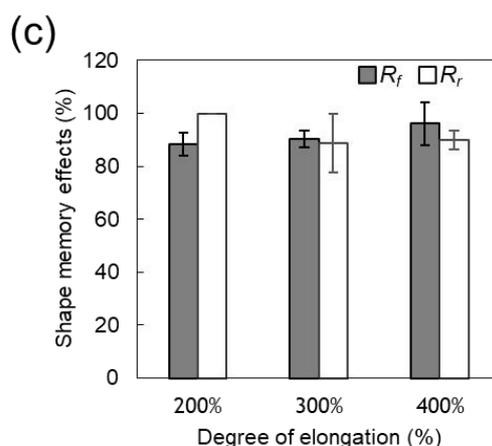
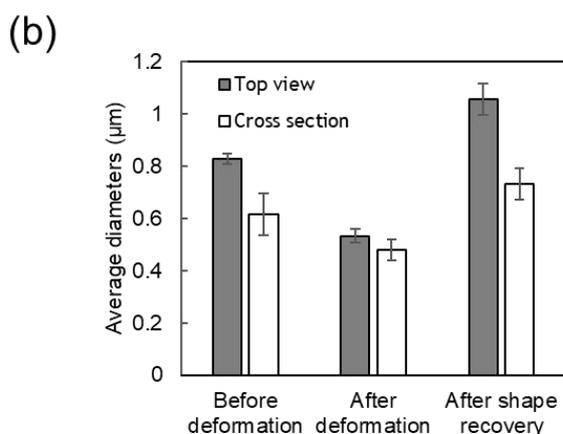
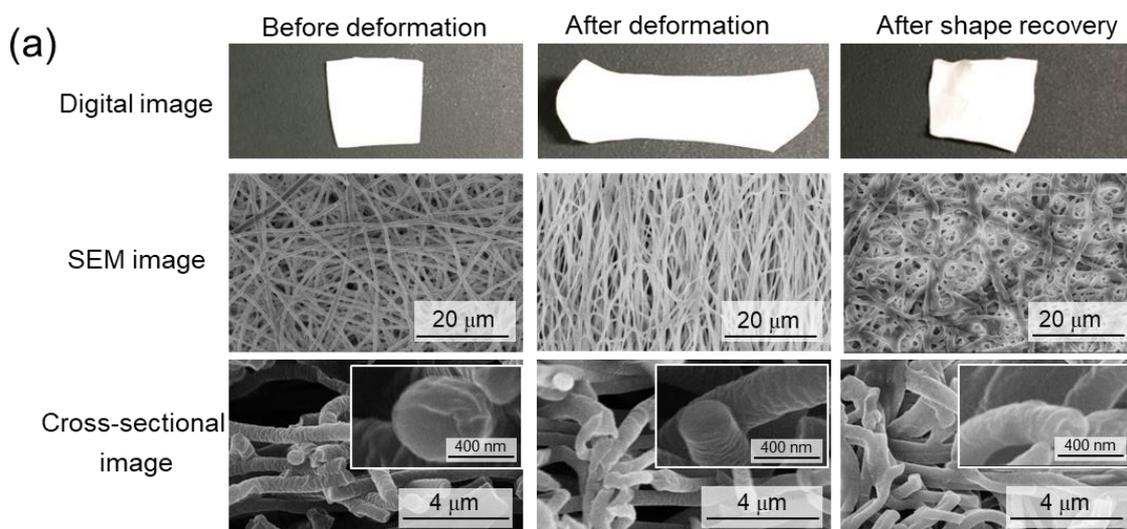


Figure 6-4. PCL-9.2 の形状記憶評価。(a)ファイバーを形状変化前、形状変化後、形状回復後のファイバーの構造評価。(b)ファイバーの形状変化時に観察されたファイバー径の変化を示したグラフ (c)200%、300%、400%延伸した際の形状固定化率(R_f)および形状回復率(R_r)

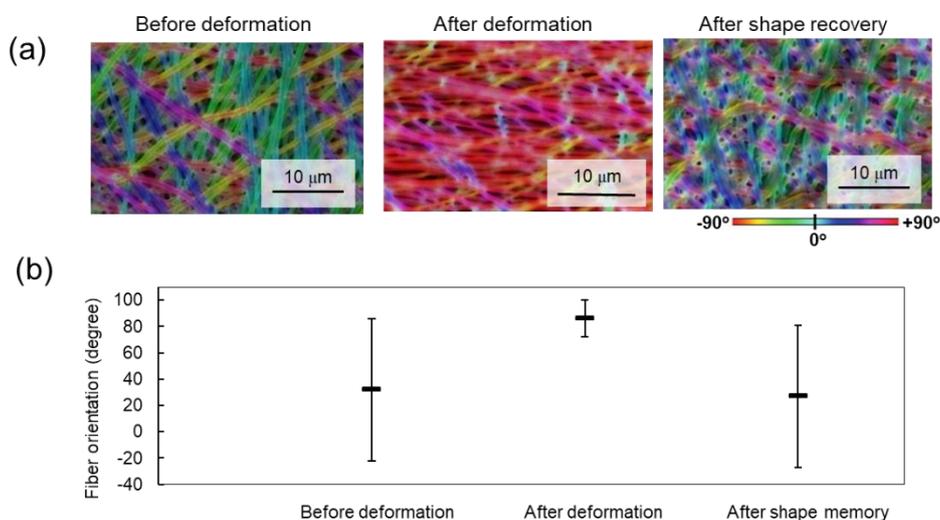


Figure 6-5. ファイバーの配向解析

6-4 結言

本章では、形状記憶ナノファイバーの設計を行い、最大 400%の伸長が可能で、かつ高い形状記憶率を有することを確認した。移植材料のそのものの形状を、移植前に任意に変化させることができるため、疾患や患部に合わせた形状の調節が可能と考えられる。

第 7 章 結言

本論文では、薬剤の治療成果や適用を向上させるために役立つ機能をもつスマートナノファイバーを用いた新たな DDS 基材の設計を行った。その結果を以下にまとめる。

2 章では、疎水性薬剤徐放用ナノファイバーメッシュの開発を行った。疎水性薬剤である PTX を内包したナノファイバーの作製を行い、徐放させることに成功した。徐放期間は 30 日以上にわたり、さらに徐放による抗腫瘍効果の増強を確認した。

3 章では、さらなる治療効果向上のため、交流磁場に応答して発熱する MNPs をナノファイバーに内包し、交流磁場の操作で発熱の制御が可能な設計とした。動物実験の結果から、温熱と薬剤の併用で治療効果が向上できることが期待できることが明らかとなった。本章の結果は、薬剤の効能を高めるだけでなく、薬剤の投入量を減少し副作用を軽減できることが期待できる。

4 章では、温度応答性高分子を利用した薬剤放出を ON-OFF 制御するナノファイバーの設計を行った。交流磁場照射によってナノファイバーから薬剤が繰り返し放出可能であり、殺細胞効果が示された。このナノファイバー設計は、近年注目されている時間治療への応用も期待できる。

5章では、生分解性を制御したナノファイバーの設計を行った。異種の高分子を用いず、同種の PCL で生分解性を短縮（制御）することに成功した。さらに本章の重要な点として、分子量の違いを利用することで、低分子量の PCL を電界紡糸することに成功した。

6章では、さらなる治療への応用として、移植部位への密着性および接着性能を高めるため、形状記憶ナノファイバーの開発を行った。PCL 構造中に、PCL の融点以上でも結晶性を維持できるハードセグメントを導入した。融点以上の加熱で可逆的な形状変化を確認した。

局所薬物徐放の利点は、血液を介さずに直接抗がん剤を標的に輸送できることであるため、間質圧が非常に高く粒子や薬剤が到達できない腫瘍組織や脳関門を突破するにあたり、非常に有用である。さらに、ナノファイバーの繊維表面構造は粘液層との接着性が強いいため、扁平上皮の癌に対して患部に貼り付けて使用可能である。また、ナノファイバーの別の利点として様々な薬物を担持することが可能であるため、扁平上皮の癌の種類に応じて内包薬物の量と種類を変えることができるため、様々な種類の扁平上皮癌に対して適用が可能であると考えられる。さらに、局所での長期薬物徐放は、本研究で使用した NCI-H23 のような薬剤耐性が発現しにくい癌に対しては非常に有用である。一方で薬剤耐性を有する細胞に対しては、薬物に温熱を併用することで薬効の改善が期待できる。実際に Figure 3-9 に示したように、温熱をかけていない状態(温熱時間 0 分)では抗がん剤の投与濃度に関わらず一定の殺傷効果を示しているが、15 分以上の温熱と併用することで殺傷効果が増強されている。さらに、別の疾患への応用として、薬物放出を ON-OFF で制御するファイバーは、体の代謝や症状が生じるタイミングに合わせた薬物投与が将来的に可能になる。例えば、食事後の血糖値が上昇した際に血糖値を下げる薬剤を放出する、またはビタミン剤のような代謝が速い薬剤を体の代謝が悪い時に放出させる、痛みが生じたときに痛み止めを放出させる、といったことが可能になる。さらに、この移植型薬物放出基材の性能を高めるために、治療後に移植材料を摘出する必要をなくするための生分解性制御や、患部への密着性を高めるための形状記憶能の付与など、移植材料の機能化も重要である。このような薬物放出を様々な制御する材料設計により、薬剤そのものの開発だけでは達成できない課題が解決できると信じている

発表リスト

[学術誌への掲載]

1. R. Garrett, **E. Niiyama**, Y. Kotsuchibashi, K. Uto, M. Ebara, “Biodegradable Nanofiber for Delivery of Immunomodulating Agent in the Treatment of Basal Cell Carcinoma”, *Fibers*, 3, 478-490(2015), (公表済)
2. T. Okada, **E. Niiyama**, K. Uto, T. Aoyagi, M. Ebara, “Inactivated Sendai Virus (HVJ-E) Immobilized Electrospun Nanofiber for Cancer Therapy”, *Materials*, 9 (1), 12 (2016), (公表済)
3. S. Ishii, K. Uto, **E. Niiyama**, M. Ebara, T. Nagao, “Hybridizing Poly(epsilon-caprolactone) and Plasmonic Titanium Nitride Nanoparticles for Broadband Photoresponsive Shape Memory Films”, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(8), 5634-5640 (2016)
4. **E. Niiyama**, K. Uto, C. M. Lee, K. Sakura, M. Ebara, “Alternating Magnetic Field-Triggered Switchable Nanofiber Mesh for Cancer Thermo-Chemotherapy”, *Polymers*, 10(9), 1018 (2018)
5. **E. Niiyama**, K. Tanabe, K. Uto, A. Kikuchi, M. Ebara, “Shape-memory Nanofiber Meshes with Programmable Cell Orientation”, *International Journal of Molecular Sciences*
6. **E. Niiyama**, K. Uto, C. M. Lee, K. Sakura, M. Ebara, “Hyperthermia Nanofiber Platform Synergized by Sustained Release of Paclitaxel to Improve Anti-tumor Efficiency”, *Advanced Healthcare Materials*, submitted, (2018)
7. WC. Lin, IT. Yeh, **E. Niiyama**, WR. Huang, M. Ebara, CS. Wu, “Electrospun Poly(epsilon-caprolactone) Nanofibrous Mesh”, *Polymers*, 10, (2018)

[その他執筆]

1. **新山瑛理**、中川泰宏、荏原充宏、“免疫反応を制御する高分子材料の設計”、バイオマテリアル 特集：免疫系とバイオマテリアル、日本バイオマテリアル学会、33(2), 144-153 (2015)
2. Rio Kurimoto, **Eri Niiyama**, Mitsuhiro Ebara, “Chapter 5.4 Fibrous Materials”, *Biomaterials Nanoarchitectonics*, Elsevier, 267-278(2016)
3. **新山瑛理**、荏原充宏、“抗癌活性を有するナノファイバーメッシュの開発”、化学工学会誌, 81(3), 137-139 (2017).
4. **新山瑛理**、宇都甲一郎、荏原充宏、“第1章ナノファイバーシートによるガン治療”、第4編シート・繊維

材料の開発と応用, 医療用バイオマテリアルの研究開発, シーエムシー出版, 187-194 (2017).

5. **Eri Niiyama**, Ailifeire Fulati, Mitsuhiro Ebara, "Chapter 4 Responsive Polymers for Smart Textiles", Smart textile, Wiley, 111-126(2018)

[国際会議における発表]

1. **Eri Niiyama**, Koichiro Uto, ChunMan Lee, Takao Aoyagi, Mitsuhiro Ebara, "Fabrication and Characterization of Hyperthermia Nanofiber Meshes for Cancer therapy"(poster) 「The 10th SPSJ International Polymer Conference (IPC2014)」, 2014.12.
2. **Eri Niiyama**, Koichiro Uto, ChunMan Lee, Takao Aoyagi, Mitsuhiro Ebara, "Fabrication and Characterization of Smart Nanofiber Meshes realizing Hyperthermia and Chemotherapy for Cancer therapy"(poster) 「MANA International Symposium 2015」, tsukuba, 2015.3.
3. **Eri Niiyama**, ChunMan Lee, Mitsuhiro Ebara, "Anticancer Nanofiber Meshes for Combined Thermo/Chemo therapy"(poster) 「Tsukuba Global Science Week 2016」, 2016.11.
4. **Eri Niiyama**, ChunMan Lee, Mitsuhiro Ebara, "Temperature responsive nanofiber meshes for thermo-chemotherapy triggered magnetic field"(poster) 「3rd international conference on biomaterials science in Tokyo」, 2016.11.
5. **Eri Niiyama**, Koichiro Uto, ChunMan Lee, Mitsuhiro Ebara, "Design of Nanofiber Meshes for Simultaneously Control of Heat and Drug for Combination Cancer Therapy", 「MANA International Symposium 2017」, 2017.3.
6. **Eri Niiyama**, ChunMan Lee, Mitsuhiro Ebara, "Temperature responsive nanofiber meshes for thermo-chemotherapy triggered magnetic field"(poster) 「2nd international Symposium on Biointerface Science and Engineering」, 2016.9.
7. **Eri Niiyama**, ChunMan Lee, Mitsuhiro Ebara, "Desifn of Smar Fiber Meshes for Simultaneous Control of Hyperthermia and Chemotherapy"(poster) 「Tsukuba Global Science Week 2018」, 2018.9.
8. **Eri Niiyama**, Koichiro Uto, ChunMan Lee, Takao Aoyagi, Mitsuhiro Ebara, " Design of Smart Nanofiber Meshes with Simultaneous Release of Heat and Drug for Combined Cancer Therapy"(poster) 「MANA International Symposium 2018」, 2018.3.

[国内学会における発表]

1. 新山瑛理, 宇都甲一郎, 李千萬, 青柳隆夫, 荏原充宏, ” がんの局所再発予防を目指した温度応答性ナノファイバーメッシュの作製と評価” (ポスター), 「第 36 回日本バイオマテリアル学会」, 2014.11
2. 新山瑛理, 宇都甲一郎, 李千萬, 青柳隆夫, 荏原充宏, ” 化学及び温熱療法を同時に達成するスマートナノファイバーメッシュの開発と評価” (ポスター) 「つくば医工連携フォーラム 2015」, 2015.1.
3. 新山瑛理, 宇都甲一郎, 李千萬, , 青柳隆夫, 荏原充宏, ” ガンの温熱および薬物療法を同時に実現するナノファイバーメッシュの開発と評価” (ポスター) 「第 6 4 回高分子年次大会」, 2015.5.
4. 新山瑛理, 宇都甲一郎, 李千萬, 青柳隆夫, 荏原充宏, ” ガンの局所再発予防を目指した温度応答性ナノファイバーメッシュの開発と評価” (口頭) 「第 6 4 回高分子年次大会」, 2015.5.
5. 新山瑛理, 小土橋陽平, 宇都甲一郎, 李千萬, 青柳隆夫, 荏原充宏, ” 誘導加熱に反応して薬物を放出する抗がんナノファイバーメッシュの開発” (口頭) 「第 37 回日本バイオマテリアル学会」, 2015.11.
6. 新山瑛理, 小土橋陽平, 宇都甲一郎, 李千萬, 青柳隆夫, 荏原充宏, ” 温熱化学療法でがんの再発を予防するスマートナノファイバーメッシュの開発” (口頭) 「第 65 回高分子年次大会」, 2016.5
7. 新山瑛理, 岡田孝春, 宇都甲一郎, 青柳隆夫, 荏原充宏, ” がん治療のための不活性化センダイウイルスを固定化したナノファイバーの開発” (ポスター) 「第 65 回高分子年次大会」, 2016.5
8. 新山瑛理, 李千萬, 荏原充宏, ” スマートポリマーを用いた “貼る” 温熱・化学療法用メッシュの開発” (口頭) 「第 33 回ハイパーサーミア学会」, 2016.9
9. 新山瑛理, 李千萬, 荏原充宏, ” 交流磁場で誘導される温熱/化学療法スマートナノファイバーメッシュの開発” (口頭) 「第 65 回高分子討論会」, 2016.9
10. 新山瑛理, 宇都甲一郎, 李千萬, 荏原充宏, ” パクリタキセルの長期徐放療法と温熱療法の相乗効果でがんを治療するスマートナノファイバーメッシュの開発” (ポスター) 「第 65 回高分子討論会」, 2016.9
11. 新山瑛理, 李千萬, 荏原充宏, ” 交流磁場で誘導される温熱/化学療法スマートナノファイバーメッシュの開発” (口頭) 「日本バイオマテリアル学会シンポジウム」, 2016.11
12. 新山瑛理, 李千萬, 荏原充宏, ” 交流磁場で誘導される温熱/化学療法スマートナノファイバーメッシュの開発” (ポスター) 「第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016」, 2016.11
13. 新山瑛理, 宇都甲一郎, 李千萬, 荏原充宏, ” がん治療のための交流磁場応答型インテリジェントナノファイバーの設計” (口頭) 「第 26 回インテリジェント材料/システムシンポジウム」, 2017.1
14. 新山瑛理, 宇都甲一郎, 李千萬, 荏原充宏, ” 薬物放出と誘導加熱を同時に制御するがん治療用ナノファイバーメッシュの開発” (ポスター) 「2017 つくば医工連携フォーラム」, 2017.1
15. 新山瑛理, 宇都甲一郎, 李千萬, 荏原充宏, ” 温熱と薬物放出を同時に制御するスマートナノファイバー

メッシュの開発” (ポスター) 「第 66 回高分子年次大会」、2017.5

16. 新山瑛理、宇都甲一郎、李千萬、荏原充宏、“温熱療法と paclitaxel 徐放の併用を可能にするナノファイバーの開発” 「第 39 回日本バイオマテリアル学会大会」、2017.11
17. 新山瑛理、宇都甲一郎、李千萬、荏原充宏、“貼るがん治療に向けたスマートナノファイバーの開発” 「理研シンポジウム」、2017.12 25
18. 新山瑛理、宇都甲一郎、李千萬、荏原充宏、“がん治療のための交流磁場応用型薬物放出ナノファイバーの設計 “ 「医工連携フォーラム 2018」、2018.1.26
19. 新山瑛理、宇都甲一郎、李千萬、荏原充宏、“局所で温熱化学療法を実現するスマートナノファイバーメッシュの開発” 「第 34 回日本 DDS 学会学術集会」、2018.6.21
20. 新山瑛理、宇都甲一郎、佐倉千萬、荏原充宏、“外科療法および温熱療法と併用できる移植型抗がん剤放出ナノファイバーの設計” 「医工連携フォーラム 2019」、2018.1.25

[受賞など]

1. 高分子学会優秀ポスター賞
(第 65 回高分子討論会 2016 年)
2. Excellent Poster Award
(Tsukuba Global Science Week, 2016)
3. Excellent Poster Presentation Award
(The 2nd international symposium on biointerface science and engineering, 2016)
4. 優秀ポスター発表賞
(第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016 年)
5. 研究奨励賞
(つくば医工連携フォーラム 2017 2017 年)
6. 平成 28 年度 NIMS 理事長賞(貢献賞)
(2016 年)
7. 研究奨励賞
(つくば医工連携フォーラム 2019 2019 年)
8. 日本学術振興会 特別研究員 DC1 採用
(2016-2019 年)

[報道]

日本経済新聞 紙面掲載 37面 2015年9月29日
常陽新聞 紙面掲載 1面 2016年7月13日
朝日新聞 紙面掲載 28面 2016年10月5日
読売新聞 紙面掲載 33面 2016年7月13日
毎日新聞 紙面掲載 31面 2016年7月23日
読売新聞 紙面掲載 33面 2016年10月23日
茨城新聞 紙面掲載 19面 2017年1月18日
NHK NEWS WEB オンライン掲載 2016年12月2日
The Economist September 16th 2017, p.71
NHK ニュース (茨城県域) 2016年12月1日
NHK ニュース (茨城県域) 2016年12月1日
茨城ニュース いば6 2016年12月1日
茨城ニュース 845 2016年12月1日
NHK ニュース いば6
TBS [わざびと]
NHK[サイエンスゼロ]

[広報活動]

茨城空港科学イベント, 2014年7月
つくば科学フェスティバル 2014, 2014年11月
平成27年度 NIMS 一般公開, 2015年4月
つくば科学出前レクチャー, 2015年6-10月
つくばサイエンスラボ 2015, 2015年11月
平成28年度 NIMS オープンハウス, 2016年4月
イノベーションキャンパス in つくば 2016, 2016年8月
美濃市青少年健全育成「市民のつどい2016」, 2016年10月
つくばサイエンスラボ 2016, 2016年11月
科学フェスタ in 茨城空港, 2016年11月
平成29年度 小・中・高校生の科学体験学習支援事業 (笠間市立南小学校), 2017年1月

平成 29 年度 NIMS 一般公開, 2017 年 4 月

いばらき子ども大学, 2017 年 8 月

つくばサイエンスラボ 2017, 2017 年 11 月

第 5 回科学の甲子園ジュニア全国大会, 2017 年 12 月

平成 29 年度 小・中・高校生の科学体験学習支援事業 (堺町立静小学校), 2018 年 2 月

かすみがうら市下稲吉小学校 2018 年 6 月 29 日

茨城こども大学 2018 年 7 月 8 日

謝辞

博士課程を修了するにあたり終始暖かく、多大なご支援・ご指導と激励を賜りました、筑波大学大学院 数理物質科学研究科 准教授 荏原 充宏 博士に深く感謝申し上げます。

博士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 数理物質科学研究科 教授 長崎 幸夫 博士、教授 Guoping Chen 博士、教授 田口 哲志 博士に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、丁寧なご指導・ご助言を賜りました日本大学 理工学部 物質応用化学科 教授 青柳 隆夫 博士、大阪大学医学部附属病院 未来医療開発部 特任准教授 佐倉 千萬 博士、東京理科大学 基礎工学部材料工学科 菊池明彦 教授に深く感謝申し上げます。

日々の実験・研究室生活においてご指導くださいました、物質・材料研究機構 グループリーダー 中西 淳 博士、主任研究員 上木 岳士 博士、主任研究員 吉川 千晶 博士、宇都 甲一郎 博士、山本 翔太 博士、静岡理工科大学 講師 小土橋陽平 博士、日本医療科学大学 保健医療学部 助教授 滑川 亘希 博士に深く感謝申し上げます。

本研究の進行にあたり、日々の生活を支えていただいた Kim Young-Jin 博士、Wei-Chin Lin 博士、Sharmy Mano Saimon 博士、Baiyao Xu 博士、Qinghui Shou 博士、岡田 孝春 博士、佐藤 健 博士、中川 泰宏 博士、栗本 理央 博士、Mu Mingwei 博士、高井 僚 氏、野村 奈生人 氏、田辺 貫太 氏、柘植 美礼 氏、矢野 宥人 氏、大内 創介 氏、Elfire Polat 氏、Jeonggyu Lee 氏、Mazaya Najmina 氏、高橋 叶子 氏、弘中 啓太 氏、山本 理恵 氏、安瀬地 千奈実 氏に感謝申し上げます。

また、日々の生活で切磋琢磨し、支え合えた同期の仲間として、菅生 健 博士 (五十音順)に感謝申し上げます。

日々の研究業務を遂行するにあたり、事務手続きなど、幅広く手助け頂きました、金田 尚子 氏、笠屋 しいな 氏、佐伯 純子 氏、飛鷹 房子 氏、松本 美友希 氏、伊藤 芳江 氏に感謝申し上げます。

アウトリーチ活動を行うにあたり多大なるご支援をいただきました、物質・材料研究機構 MANA アウトリーチチームの葉山 雅 氏、立石 美紀氏、岩渕 容子 氏、松井 龍也 氏、津毛 邦仁 氏、Difei Miao 氏に深く感謝申し上げます。

本研究は、NIMS ジュニア研究員(修士課程 1 年～2 年)および日本学術振興会特別研究員(博士課程 1 年～3 年)に遂行されたものであり、この支援があつてこそ有意義な五年間を過ごすことができたものであり、ここに感謝の意を示します。

私、新山瑛理が筑波大学大学院にて過ごすことができた実りある5年間は、筑波大学の職員の皆様、物質・材料研究機構の職員の皆様、筑波大学の先輩・同期・後輩の皆様をはじめとした、私に関わって下さった全ての方々の尽きないご理解・ご協力の元に成り立っておりました。私に関わってくださいました全ての方々に今一度、心より御礼申し上げます。

最後に、日頃から温かく見守り支えて頂いた家族に心より感謝致します。

2019年2月

新山 瑛理