

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659873

研究課題名(和文)濃度センサー機能を有した世界初のドラッグデリバリーシステムへの挑戦

研究課題名(英文)Challenge to the world's first drug delivery system having a drug-concentration sensing function

研究代表者

吉田 靖弘 (Yoshida, Yasuhiro)

岡山大学・歯学部・博士研究員

研究者番号：90281162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：濃度センサー機能を有した世界初のドラッグデリバリーシステムを開発するため、異なるリン酸化率のリン酸化プルラン(PPL)を合成して抗菌物質の担体として用いた。抗菌物質CPCのみでは高濃度でも洗浄後は十分な抗菌効果が得られなかったが、PPLとの複合体することにより、わずか100ppmの抗菌物質で優れた抗菌効果を発揮することが明らかとなった。PPL-CPC複合体はCPC濃度200ppmでも優れた抗菌効果を発現したが、300、400、500ppmでは抗菌効果を発現しなかった。以上の結果より、PPLは濃度センサー機能を有したドラッグデリバリーシステムの担体として有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To develop the world's first drug delivery system having a drug-concentration sensing function, we synthesized phosphorylated pullulan (PPL) with several phosphorylation ratios as the carrier for bactericide delivery. Only cetylpyridinium chloride (CPC) showed no effect on bacterial growth after slight rinsing, even at a high concentration of CPC. However, it was revealed that the complex of 0.01% PPL and 0.01% CPC (0.01% PPL-CPC) consistently exhibited an antibacterial effect, even after rinsing with distilled water. Although 0.02% PPL-CPC also showed an excellent antibacterial effect like 0.01% PPL-CPC, 0.03, 0.04 and 0.05% PPL-CPC have no effect on bacterial growth after slight rinsing. These facts indicated that PPL is available as a carrier for drug delivery system having a drug-concentration sensing function.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 歯科医用工学・再生歯学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム DDS 担体 リン酸化プルラン 塩化セチルピリジニウム CPC 濃度 抗菌

## 1. 研究開始当初の背景

ドラッグデリバリーシステム(DDS)は国内外で研究開発が盛んに行われている最も注目を集める研究課題の一つである。このDDSの多くは高分子を薬剤の担体として活用している。特に、多糖類は天然に存在する高分子であり、様々な活性や機能を持つことから、その活用が期待されている。

Cetylpyridinium chloride (CPC) は正電荷を持つため細菌表面の電位を攪乱し、電荷のバランスを崩すことでう蝕などの原因菌を殺菌すると考えられている。また、プラーク抑制効果、歯肉炎改善効果を有することから広く利用され、抗菌作用を謳う口腔ケア製品の主要成分として広く使用されている。しかし、多くの口腔ケア製品が市販されている中で、抗菌物質を歯質表面に留め、長期的な抗菌効果を有する物はない。これは、殺菌剤の有害作用を避けるため、薬剤を高濃度で使用できないことに起因する。

## 2. 研究の目的

低濃度時にのみ機能するドラッグデリバリーシステム(DDS)があれば、殺菌剤や抗がん剤などが有害作用の強い薬剤も効果的に使用でき、未来医療のブレークスルーとなることは間違いない。前述の口腔ケア製品の抱える問題点も解決できる。しかし現在まで、薬物濃度のセンサー機能を有したDDSに関しては全く報告がない。研究代表者が開発した多糖誘導体が薬物の濃度変化に伴いイオン結合から疎水性相互作用へと会合状態を変えることに着目し、会合体の構造変化により濃度を検知して機能する濃度センサー付インテリジェントDDSを創製することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 多糖誘導体の合成

担体となる多糖誘導体について、将来的な実用化を視野に入れ、工業的に大量製造が可能な合成方法を検討した。

### (2) 合成した多糖誘導体リン酸化プルランとプルラン(PPL)の固有粘度測定

物性評価のため、溶媒を水としてUbbelohde

型粘度計を用い、25℃におけるPPLとプルランの相対粘度を測定し比較した。

### (3) PPL-CPC複合体の機能評価

PPLとCPCの各溶液を混合することによって得られる複合コロイド溶液に歯表面のモデル物質であるハイドロキシアパタイト板を漬けた後、2回蒸留水で洗浄した。その後、そのハイドロキシアパタイト表面上にう蝕原因菌を播種して培養し、増殖に及ぼす影響を走査型電子顕微鏡観察により評価した。

### (4) PPL-CPC複合体の構造解析

PPLとCPCの混合比を抗菌試験で効果が確認されている1:1で濃度を調整し、複合体の濁りを分光光度計で評価した。

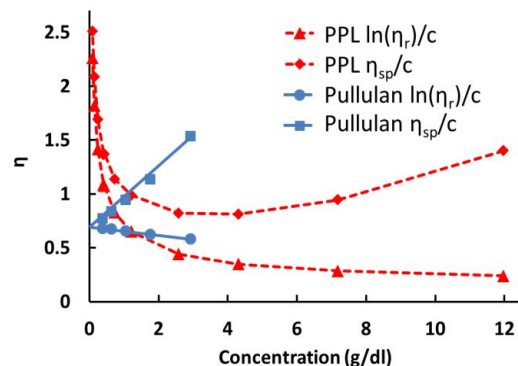
## 4. 研究成果

### (1) 多糖誘導体の合成

プルランを塩基処理して塩化ホスホリルを加えることでリン酸化プルラン(PPL)が得られた。脱塩処理などによって精製したPPLについてリン酸定量及びICP・IRなどにより、リン酸基が導入されていることを確認した。また、仕込み量を調整することでリン酸置換度(DS (Degree of Substitution): グルコース残基中に存在する三つの水酸基のうち何個がリン酸基に置換されているかを示す指標)がDS = 0.07・0.10・0.14のPPLが得られた。しかしながら、水酸化ナトリウムを加えなかったところPPLが得られなかった。プルランをリン酸化するには塩基処理することによってグルコースの水酸基を活性化させることが必要であることが分かった。

### (2) 合成した多糖誘導体リン酸化プルランとプルランの固有粘度測定

下図のように、プルランは直線であるのに



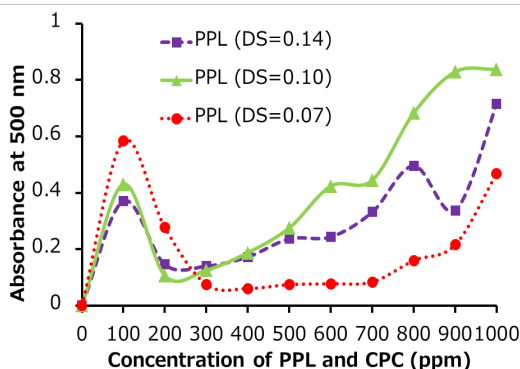
対し、リン酸化が進んだPPLでは希薄濃度領域で還元粘度の上昇が見られた。これは、希薄濃度領域でリン酸基の反発の影響が大きくなるために見かけ上の粘度が上昇するためである。このことから、PPLの水酸基がリン酸基に置換している高分子電解質であることがわかった。

### (3)PPL-CPC複合体の機能評価

複合体100～500ppmの抗菌効果を測定すると、300～500ppmでは抗菌効果を発現せず、100ppmと200ppmで抗菌効果を発揮した。

### (4)PPL-CPC複合体の構造解析

下図のように、リン酸置換度DS = 0.7・0.10・0.14と異なるPPLを用いたが、どの場合においても複合体1000 ppmでは濁りを生じて濃度を低くしていくとそれにつれて濁りも薄くなっていくが、100 ppmで再び濁りを生じることが分かった。これは、CPCの臨界ミセル濃度が約300 ppmであることから、300 ppm以上ではCPCがミセルを形成してCPCをPPLが内包しているミセル型の複合体を形成し、300 ppm以下ではCPCがミセルを形成せずPPL上に分散した形をとる非ミセル型の複合体を形成すると考えた。



このことから、(3)で行った細菌増殖実験の結果は、300ppm以上の高濃度域ではミセル型の複合体を形成するためにCPCがPPLに内包されているために抗菌効果を発揮出来ず、300ppmより低い濃度域では非ミセル型の複合体を形成するためCPCが複合体の表面に存在し、除放するために殺菌効果を発揮すると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計22件)

原著論文18件

Park, S.H., Zhu, L., Tada, S., Obuse, S., Yoshida, Y., Nakamura, M., Son, T. II, Tsuneda, S., Ito, Y.

Phosphorylated gelatin to enhance cell adhesion to titanium. *Polymer International* (in press). 査読有  
DOI: 10.1002/pi.4647

Yoshihara K, Yoshida Y, Hayakawa S, Nagaoka N, Kamenoue S, Okihara T, Ogawa T, Nakamura M, Osaka A, Van Meerbeek B. Novel fluoro-carbon functional monomer for dental bonding. *Journal of Dental Research* 93:189-194, 2014. 査読有

DOI: 10.1177/0022034513514447

Mazaki, T., Shiozaki, Y., Yamane, K., Yoshida, A., Nakamura, M., Yoshida, Y., Zhou, D., Kitajima, T., Tanaka, M., Ito, Y., Ozaki, T., Matsukawa, A. A novel, visible light-induced, rapidly cross-linkable gelatin scaffold for osteochondral tissue engineering. *Scientific Reports* 4: 4457, 2014. 査読有

DOI: 10.1038/srep04457

Yang, X., Zhu, L., Tada, S., Zhou, D., Kitajima, T., Isoshima, T., Yoshida, Y., Nakamura, M., Yan, W., Ito, Y.

Mussel-inspired human gelatin nano-coating for creating biologically adhesive surfaces.

*International Journal of Nanomedicine* 9: 2753-2765, 2014. 査読有

DOI: 10.2147/IJN.S60624

Mazaki, T., Kitajima, T., Shiozaki, Y., Sato, M., Mino, M., Yoshida, A., Nakamura, M., Yoshida, Y., Tanaka, M., Ozaki, T., Matsukawa, A., Ito, Y. *In vitro* and *in vivo* enhanced

osteogenesis by kaempferol found by a high-throughput assay using human

mesenchymal stromal cells. *Journal of Functional Foods* 6: 241-247, 2014. 査読有

DOI: 10.1016/j.jff.2013.10.013

Shang, Y., Tamai, M., Ishii, R., Nagaoka, N., Yoshida, Y., Ogasawara, M., Yang, J., Tagawa, Y. Hybrid sponge comprised of galactosylated chitosan and hyaluronic acid mediates the co-culture of hepatocytes and endothelial cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117: 99-106, 2014. 査読有

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.06.015

Cardoso, M.V., Chaudhari, A., Yoshida, Y., Van Meerbeek, B., Naert, I., Duyck, J. Bone-tissue response to implant surfaces functionalized with phosphate-containing polymers. *Clinical Oral Implants Research* 25: 91-100, 2014. 査読有

DOI: 10.1111/clr.12053

Yoshihara, K., Yoshida, Y., Nagaoka, N., Hayakawa S, Okihara, T., De Munck, J., Maruo, Y., Nishigawa, G., Minagi, S., Osaka, A., Van Meerbeek, B. Adhesive interfacial interaction affected by different carbon-chain monomers. *Dental Materials* 29: 889-897, 2013. 査読有

DOI: 10.1016/j.dental.2013.05.006

Shiozaki, Y., Kitajima, T., Mazaki, T., Yoshida, A., Tanaka, M., Umezawa, A., Nakamura, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Ozaki, T., Matsukawa, A. Enhanced *in vivo* osteogenesis by nanocarrier-fused bone morphogenetic protein-4. *International Journal of Nanomedicine* 8: 1349-1360, 2013. 査読有

DOI: 10.2147/IJN.S44124

Yonehiro, J., Yoshida, Y., Yamashita, A., Yoshizawa, S., Ohta, K., Kamata, N., Okihara, T., Nishimura, F. Flavonol-containing phosphorylated pullulan may attenuate pulp

inflammation. *International Endodontic Journal* 46:119-127, 2013. 査読有

DOI:

10.1111/j.1365-2591.2012.02095.x

Yamamoto, H., Kawai, M., Shiotsu, N., Watanabe, M., Yoshida, Y., Suzuki, K., Maruyama, H., Miyazaki, J., Ikwgame, M., Bessho, K., Yamamoto, T. BMP-2 gene transfer under various conditions with *in vivo* electroporation and bone induction. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 24:49-53, 2012. 査読有

DOI: 10.1016/j.ajoms.2011.10.006

Yonehiro, J., Yamashita, A., Yoshida, Y., Yoshizawa, S., Ohta, K., Kamata, N., Okihara, T., Nishimura, F.

Establishment of *ex vivo* pulpitis model by co-culturing immortalized dental pulp cells and macrophages.

*International Endodontic Journal*

45:1103-1108, 2012. 査読有

DOI:

10.1111/j.1365-2591.2012.02074.x

Yoshida, Y., Yoshihara, K., Hayakawa, S., Nagaoka, N., Okihara, T., Matsumoto, T., Minagi, S., Osaka, A., Van Landuyt, K., Van Meerbeek, B. HEMA inhibits interfacial nano-layering of the functional monomer MDP. *Journal of Dental Research* 91:1060-1065, 2012. 査読有

DOI: 10.1177/0022034512460396

Yoshida, Y., Yoshihara, K., Nagaoka, N., Hanabusa, M., Momoi, Y. X-ray diffraction analysis of three-dimensional self-reinforcing monomer and its chemical interaction with tooth and hydroxyapatite. *Dental Materials Journal* 31:697-702, 2012. 査読有

DOI:

<http://dx.doi.org/10.4012/dmj.2012-074>

Harimoto, K., Yoshida, Y., Yoshihara,

K., Nagaoka, N., Matsumoto, T., Tagawa, Y. Osteoblast Compatibility of Materials Depends on Serum Protein Absorbability in Osteogenesis. *Dental Materials Journal* 31:674-680, 2012.

査読有

DOI:

<http://dx.doi.org/10.4012/dmj.2012-075>

Kawashita, M., Taninai, K., Li, Z., Ishikawa, K., Yoshida, Y. Preparation of low-crystalline apatite nanoparticles and their coating onto quartz substrates. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23:1355-1362, 2012. 査読有

DOI: 10.1007/s10856-012-4614-6

Mine, A., De Munck, J., Cardoso, M.V., Van Landuyt, K.L., Poitevin, A., Kuboki, T., Yoshida, Y., Suzuki, K., Van Meerbeek, B. Effect of

low-shrinking composite on the bonding effectiveness of two adhesives in occlusal Class-I cavities. *Dental Materials Journal* 31:418-426, 2012.

査読有

DOI:

<http://dx.doi.org/10.4012/dmj.2011-261>

Yoshida, Y., Yoshihara, K., Nagaoka, N., Hayakawa, S., Torii, Y., Ogawa, T., Osaka, A., Van Meerbeek, B.

Self-assembled nano-layering at the adhesive interface. *Journal of Dental Research* 91:376-381, 2012. 査読有

DOI: 10.1177/0022034512437375

総説 3件

吉田靖弘, 吉原久美子, 井上哲. 歯質に対する接着耐久性を考える - アパタイトとの化学的相互作用 - . *DE (Dental Engineering) 日本歯科理工学会誌* 32:257-260, 2013. 査読無

吉田靖弘. 接着と合着を再考する 歯質接着のためのナノ界面分析 . *日本補綴歯科学会誌* 4:353-363, 2012. 査読無

Yoshida, Y., Inoue, S. Chemical analyses in dental adhesive technology. *The Japanese Dental Science Review* 48:141-152, 2012. 査読有  
DOI: 10.1016/j.jdsr.2012.03.001

〔学会発表〕(計1件)

Yoshida, Y., Okihara, T., Nakamura, M., Matsumoto, T. (Oct 21-24, 2012, Fukuoka, Japan) Phosphorylated pullulan bioadhesive for regeneration and reconstruction of bone and tooth. 24<sup>th</sup> Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine.

〔図書〕(計4件)

伊藤義浩, 吉田靖弘. 第6部 製品種別ごとのデータ・情報の取得とまとめ方のポイント. 第26章 再生医療製品, 再生医療用基材における留意点. 医薬品・医療機器 承認取得のためのデータ・情報の取得とまとめ方, 株式会社技術情報協会, 東京 (in press)

Van Meerbeek, B., Yoshida, Y. Basics in adhesion technology: In Caries management - Science and Clinical Practice. (Meyer-Lückel, H., Paris, S., Ekstrand, K. Ed.) Thieme Medical Publishers, Inc., Stuttgart, Germany, Chapter 14 pp. 208-223, 2013.

Yoshida, Y., Okihara, T., Nakamura, M., Matsumoto, T. Phosphorylated pullulan bioadhesive for regeneration and reconstruction of bone and tooth. *Key Engineering Materials* 529-530:516-521, 2013.

Nakamura, M., Yoshida, Y., Ito, Y. Visible Light-Induced Crosslinkable Gelatin for Direct Pulp Capping. *Key Engineering Materials* 529-530:543-546, 2013.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

吉田 靖弘 (YOSHIDA YASUHIRO)

岡山大学・歯学部・博士研究員

研究者番号：90281162