

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410228

研究課題名(和文)リン酸化プルランを用いた硬組織接着型高機能DDSの開発

研究課題名(英文)Development of hard tissue adhesive drug delivery system based on phosphorylated pullulan

研究代表者

沖原 巧 (OKIHARA, Takumi)

岡山大学・自然科学研究科・講師

研究者番号：70243491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：多糖のひとつであるプルランをリン酸化したリン酸化プルランと抗菌性を持つカチオン性界面活性剤との複合体を骨や歯の硬組織への接着する薬剤徐放体として開発し、その構造および物性を解明した。この複合体では、界面活性剤の正の電荷とリン酸基の持つ負の電荷の中和と、リン酸化プルランの糖鎖と界面活性剤のアルキル鎖の間での疎水性相互作用のバランスで成り立っていることがわかった。リン酸化プルランのリン酸化率を制御することにより徐放期間を制御可能であることがわかった。さらに他のリン酸化多糖との比較からプルランが、最も徐放させる担体として優れていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Hard tissue adhesive drug delivery system based on phosphorylated pullulan has developed. Elucidation of the complex formation mechanism and Control of drug release of phosphorylated pullulan and cationic surfactants was reported. Relationship between complex formation and pH, degree of substitution, ionic-strength indicated that neutralization of charge between phosphate group and cation and hydrophobic interaction has important role in complex formation.

研究分野：高分子化学

キーワード：プルラン 多糖 リン酸化 界面活性剤 抗菌剤 DDS

1. 研究開始当初の背景

現在、薬物を病変部分的に的確に供給するドラッグデリバリーシステム(DDS)に関する研究が盛んにおこなわれている。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。また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、その活用が検討されている。

CPC (cetylpyridinium chloride) 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虫歯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²⁾、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として多く市販されている。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。そのために、口腔内では虫歯・歯周病・口臭などの問題のほか、特に抗がん剤などによって抵抗力の低下した患者の口腔ケアや要介護者の誤嚥性肺炎の予防のための口腔ケアにおいて介護者の負担軽減のために長期的な抗菌効果が必要とされている。そこで、歯質表面に殺菌剤を留めるような担体の開発が必要である。

2. 研究の目的

薬剤と複合体を形成するためのキャリアとして用いる担体の高分子としてはペプチド・合成高分子・多糖などが考えられるが、ペプチドは生理活性、合成高分子は分解物等の安全性に問題があるため生体内では用いることが困難である。そこで我々は担体として多糖を選択した。用いる多糖には主鎖にグルコースを用いるが、グルコースを骨格としていても、その結合様式の違いにより物性が大きく変化する。そのためグルコース系の多糖でもプルラン、アミロース、アミロペクチン、デキストランなどそれぞれ性質が全く異なる。我々は、この多糖の中で、薬剤徐放体として活用する際に重要となる、安定性、粘性、反応性などの点からプルラン³⁾に着目した。プルランはグルコースのみからなる多糖類の一種であり、分子量は約20万で、水溶性に優れ、増粘性、接着性、付着性、粘着性、造膜性、被膜性を持つ材料として優れた多糖である。これらの性質から、化粧品・医薬品・食料品などに利用されており、特に、デンプン由来のため可食性であるにも関わらず、口内や胃などでは容易に消化されないことから口腔内での薬剤の担体として用いるのに適している。

一方で、リン酸基は生体内で硬組織である歯や骨を構成するハイドロキシアパタイトへ高い吸着性を示すことから、多糖にリン酸基を導入したリン酸化多糖は歯や骨を標的として吸着させる薬剤担体としての可能性がある。そのため、本研究ではリン酸化多糖を薬剤担体として、ターゲット指向性と徐放性を有し、放出制御を行うインテリジェントなDDSの開発を行うことを目的とする。

しかし、現在の多糖のリン酸化方法をリン酸化プルラン(PPL)に適用するとコストが高く、実用的でないため量産に向けた合成方法の開発が必要である。そして、このPPLを担体とした殺菌剤デリバリーシステムを創製し、薬剤徐放能の分析および構造決定と物性評価を行い、リン酸化多糖の薬剤徐放担体としての実用化を目指すものである。

3. 研究の方法

二つの方法によりリン酸化多糖を合成した。一つは多糖に塩基処理を行い、塩化ホスホリルを加えることによりリン酸化を行った。得られた反応物は、酢酸セルロース膜を用いた透析により脱塩を行い、不溶物を濾別した。濾液をポリエーテルスルホン膜で限外ろ過することによる濃縮を行い、凍結乾燥により精製を行った。得られた反応物のリン含有量はICP発光分光分析により測定した。また、モリブデンブルー法による遊離リン酸の定量や固有粘度測定、中和滴定等により多糖にリン酸基が導入されていることを確認した。もう一つはマイクロ波加熱を用いたリン酸化法であり、多糖とリン酸塩類を反応容器に入れ、マイクロ波反応装置を用いてリン酸化を行った。

リン酸化プルランとカチオン性界面活性剤であるCPCは高い抗菌効果を発現するが、リン酸化プルランとCPCの組成比に依存していることがわかっている。抗菌効果を発現する組成比の時、複合体溶液は白濁しており、この溶液内で形成されている複合体が持続的な抗菌効果の発現に参与していると示唆される。そこで、複合体溶液の白濁に着目し、濁度を評価し、複合体メカニズムの検討を行った。グルコース残基の結合様式の異なるリン酸化プルラン:PPL(糖鎖骨格は-1,4と-1,6結合)、リン酸化アミロース:PAM(糖鎖骨格は-1,4結合)、リン酸化デキストラン:PDeX(糖鎖骨格は-1,6結合)を用いて、多糖の鎖状構造に着目し比較検討を行った。

4. 研究成果

塩化ホスホリルを用いた直接リン酸化法により、リン酸化度の異なるプルランを再現性よく調製することが可能となった。マイクロ波を用いたリン酸化では次に、アミロースのリン酸化と同条件で各種多糖のリン酸化を行った(Table 1)。アミロースに加え、グアーガムやグルコマンナン等の高粘性多糖においてもリン酸化が進行した。しかし、キトサンやカラギーナン等のイオン性多糖では電荷反発等の影響でリン酸化は進行しにくかった。中性多糖の中でも糖鎖の結合様式が異なると反応性の違いが生じており、グルコース残基の結合様式の違いによる水溶性の違いが、反応性に影響していると考えられる。リン酸エステル化反応は反応により水が生じる。マイクロ波反応装置では物質内部まで効率的に加熱が行えるため、高粘度の多糖においても反応により生じた水分子を系

Table 1 Phosphorylation of polysaccharides by microwave heating.

$\begin{array}{c} \text{NaH}_2\text{PO}_4 \\ \text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ (Crystal)} \\ \text{B} \xrightarrow{\text{Microwave}} \text{phosphorylated B} \end{array}$		
Entry	B	P (%) ^a
1	amylose	11.7
2	pullulan	3.0
3	dextran	2.5
4	agar	3.2
5	guar gum	3.3
6	glucomannan	2.1
7	chitosan	0.7
8	k-carrageenan	0.5

^a Determined by ICP.

内から効率的に除去することができ、リン酸化反応が進行したと考えられる。また、リン酸イオンや水分子はマイクロ波の効果を受けやすく容易に励起されるが、糖鎖に付加したリン酸は、分子が運動しにくくなり容易には励起されにくくなる。そのためリン酸エステルの解離反応は起こりにくく、結果として反応の平衡がリン酸化側に偏ったのではないかと考えられる。

複合体形成メカニズムについては、リン酸置換度の異なるリン酸化多糖を用いて CPC と複合化し、最も濃厚な濁りを生じた際の CPC とリン酸化多糖の混合比率を測定した。結合様式が異なると、濁りを生じて複合体を形成する混合比が異なることがわかった。また、濁りを生じて複合体を形成した際の混合比の値は、リン酸化多糖のリン酸置換度に比例することがわかった (Fig. 1)。

イオン交換樹脂を用いてリン酸化多糖中の Na を H に置換し、水酸化ナトリウム水溶液を添加することにより pH の異なるリン酸化多糖を得た。各 pH のリン酸化多糖水溶液と CPC 水溶液を混合し、最も濃厚な濁りを生じた際の CPC とリン酸化多糖の混合比率を測定した。水酸化ナトリウム水溶液を用いたリン酸化多糖の滴定曲線からリン酸基の解離状態を推定した。結合様式による複合体形成の際の混合比率の違いはあるが、リン酸化多糖中のリン酸基の解離状態が変化すると複合体を形成する混合比が変化することがわかった。また、分子鎖の拡がりや評価するために各 pH の PPL の固有粘度測定を行った。リン酸基の解離の状態により還元粘度が異なり、リン酸基がより解離することにより還元粘度が大きくなり、糖鎖が広がっていることがわかった。

溶液のイオン強度がリン酸化多糖の拡が

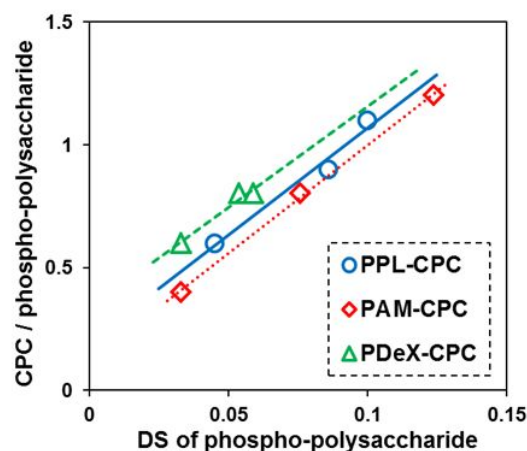


Fig. 1 The dependence of the complex composition ratio on the DS of phospho-polysaccharide.

りに与える影響を検討するために、PPL に塩化ナトリウム水溶液を添加して固有粘度測定を行った。塩化ナトリウムの添加により低濃度域での還元粘度の上昇が小さくなり、リン酸基の電荷が遮蔽されることで糖鎖の拡がりや小さくなる様子が観察された。さらに、PPL - CPC 複合体形成において、塩化ナトリウムを添加し、溶液のイオン強度を変化させて、CPC と PPL のモル比率とイオン強度が複合体溶液の濁り形成に与える影響を調べた。複合体形成にはリン酸基とピリジニウム基との電荷の中和と、糖鎖とアルキル鎖との疎水性相互作用の両方が働くが、添加塩を加えない場合は、リン酸基とピリジニウム基の中和の支配が強く、特定の比率で濁りが濃くなることがわかった。イオン強度が 0.05 付近では、リン酸基の電荷が若干遮蔽されるため疎水性相互作用が優先され、このときは混合比率に依存しなくなった。さらにイオン強度が大きくなると、リン酸基の電荷が遮蔽され、疎水性相互作用の影響が強くなるが、界面活性剤同士の反発により複合体を形成しなくなった。

これらの検討から、リン酸化多糖の結合様式やリン酸基の電荷反発の大きさによる螺旋構造の変化が複合体形成に影響しており、電荷と疎水性の相互作用の複合的な作用により複合体が形成されていることがわかった。リン酸基の解離が進むか、糖鎖中のリン酸基が増加することで、リン酸基同士の電荷反発が増大し、そのため糖鎖が拡がり、収容する CPC が増加することで複合体を形成する混合比が変化することがわかった。また、過剰なイオンによりリン酸基の電荷が遮蔽されることで、疎水性相互作用の影響が支配的になるが、CPC 同士の反発もあり、複合体を形成しなくなることがわかった。

グルコース残基の結合様式の異なる PPL、PAM、PDeX を用いて、複合体の抗菌試験を行った。リン酸化多糖 - CPC 複合体溶液に歯のモデル物質である HAp 板を浸漬させた後、蒸留水で二回洗浄した。その後、HAp 板を菌液に浸漬

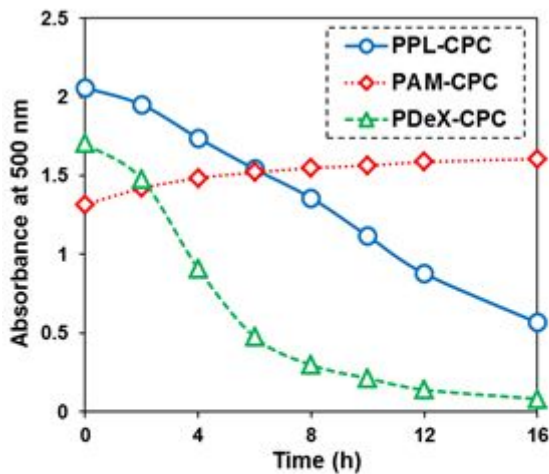


Fig. 2 Time courses for turbidity change of complex solution of PPL-CPC, PAM-CPC and PDeX-CPC.

し、12 時間後の培養の様子を観察した。PPL 複合体では、菌液の白濁はなく菌の増殖は見られなかった。PDeX 複合体では、菌液が少し白濁しており、わずかな菌の増殖が見られた。PAM 複合体では、菌液が白濁しており菌の増殖が観察された。

グルコース残基の結合様式の異なる PPL、PAM、PDeX を用いて、濁りの消失による安定性評価を行った (Fig. 2)。PPL 複合体では、徐々に濁りが消失し複合体が解消されることがわかった。PDeX 複合体では、速やかに濁りが消え PPL よりも不安定な複合体であることがわかった。PAM 複合体では、濁りの消失はほとんどなく、安定な複合体であることがわかった。

これらの検討から、結合様式による螺旋構造の違いにより複合体の安定性が異なり、複合体が徐々に解消されることで CPC が徐放され、持続的な抗菌効果が発揮されることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tomohiro Takahata, Takumi Okihara, Yasuhiro Yoshida, Kumiko Yoshihara, Yasuyuki Shiozaki, Aki Yoshida, Kentaro Yamane, Noriyuki Watanabe, Masahide Yoshimura, Mariko Nakamura, Masao Irie, Bart Van Meerbeek, Masato Tanaka, Toshifumi Ozaki, Akihiro Matsukawa,

Bone engineering by phosphorylated-pullulan and β -TCP composite

Biomedical Materials, (査読有), 10(2015)65009

DOI

dx.doi.org/10.1088/1748-6041/10/6/065009

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 沖原 巧, 亀ノ上翔吾, 難波尚子, 吉田靖弘, 長岡紀幸, 高柴正悟

リン酸化多糖と界面活性剤との複合体による持続的作用を持つ口腔用抗菌剤の開発
第 20 回セルロース学会年次大会(2013/7/18)
京都大学宇治キャンパス(京都府宇治市)

2. 岡島裕樹, 湯浅雅人, 沖原巧
リン酸化多糖のマイクロ波合成と界面活性剤との複合体形成メカニズム
第 63 回高分子学会年次大会(2014/5/28)
名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

3. 沖原 巧, 岡島 裕樹, 亀ノ上 翔吾, 難波尚子, 長岡 紀幸, 高柴 正悟, 吉田 靖弘
リン酸化プルランを基材とした持続型口腔ケア剤の機能発現メカニズム
第 63 回高分子討論会(2014/9/24)

長崎大学(長崎県長崎市)

4. 渡邊俊・岡島裕樹・亀ノ上翔吾・沖原巧
リン酸化多糖 - 界面活性剤の複合体構造の解明 第 64 回高分子学会年次大会(2015/5/27) 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

5. 沖原 巧・岡島裕樹・亀ノ上翔吾
リン酸化多糖とカチオン性界面活性剤の複合体形成と徐放メカニズム
第 22 回セルロース学会年次大会(2015/7/9)
北海道大学(北海道札幌市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

沖原 巧 (OKIHARA, Takumi)

岡山大学・自然科学研究科・講師

研究者番号：70243491

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：