

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15716

研究課題名(和文) 濃度センシング機能を持つ世界初のドラッグデリバリーキャリア創製への挑戦

研究課題名(英文) test

研究代表者

阿部 薫明(abe, shigeaki)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40374566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：低濃度でのみ薬剤徐放するドラッグデリバリーシステム(DDS)を開発することにより、抗がん剤など副作用の強い薬剤も効果的に使用可能な、濃度センサー機能を有したDDSの開発を試みた。DDSキャリアとしてリン酸化プルラン(PPL)を、徐放機構のモデル薬剤として抗菌物質CPCを用いたところ、PPLとの複合体にすることにより、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になった。一方で、高濃度で調整した複合体では抗菌効果を発現しなかった。これらの結果は、CPC-PPL複合体が、低濃度時に機能し得る濃度センサー機能を有した画期的なDDSの開発に向けて有用な物質であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigate in a novel drug delivery system with drug-concentration sensing property. For this purpose, phosphorylated polysaccharide consisting glucose, pullulan PPL), is synthesized as a drug carrier. This polymer shows excellent low viscosity and adhesive properties to hard tissue. When the PPL mixed with a typical antibacterial agent, cetylpyridinium chloride (CPC), the mixture indicated turbid depending on the concentration. It suggests less-soluble complex formation between PPL and CPC.

To elucidate their ability of drug carrier, the mixture was adsorbed on the surface of hydroxyapatite and then *S. mutans* were cultured on the apatite plate. When only CPC was treated on the surface at 10%, they grew as same as non-coated ones. However, the plate coated with PPL-CPC complex even at 0.01%, they observed rarely. It suggests that PPL can adhesive to the apatite and the complex releases effectively. Therefore, PPL-CPC complex can allow to a newly concentration sensing carrier.

研究分野：生体材料

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 濃度センサー機能

1. 研究開始当初の背景

必要に応じて薬剤の徐放量を制御するドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発は、国内外で盛んに研究が行われており、最も注目を集める研究課題の一つである。こ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。

Cetylpridinium chloride(CPC)は正電荷を持つため細菌表面の電荷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使用されている。これまでに、多くの口腔ケア製品が市販されているが、抗菌物質を歯質表面に留め、長期的な抗菌効果を有するシステムは実現されていない。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

濃度に応答して、低濃度で薬剤を徐放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有害作用の強い薬剤も効果的に使用することが可能となり、投薬療法の可能性を大きく改善し得る。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。そこで、我々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、工業的に大量生産が可能な合成方法を検討した。

(2)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を用い、歯表面のモデル物質であるハイドロキシアパタイト板(HAp)を浸漬した。洗浄後に、HAp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で観察した。

(3)PPL-CPC複合体の構造解析

PPLとCPCの混合比を1:1に調整し、複合体の濁りを分光学的に評価した。

(4)ナノ多孔質シリカを用いた薬剤徐放

薬剤徐放の制御の手法の一つとして、ナノ多孔質シリカ粒子(NPS)を作成し、歯科用セメントと混合、練和してディスク状の試料片を作成した。得られた試料片をCPCや色素分子水溶液へと24h浸漬し、洗浄後蒸留水へと浸漬した。毎日上澄液を交換し、分光光度計を用いて徐放量を追跡した。

PPLとCPCの混合比を1:1に調整し、

複合体の濁りを分光学的に評価した。

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、IR、ICPを用いてリン酸基の導入を確認した。また、反応開始の組成を調整することでリン酸置換度(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のかを示す指標)の異なるPPLの作製に成功した。一方、水酸化ナトリウムを加えない場合にはPPLが得られなかった。プルランをリン酸化するには水酸基を活性化させることが必要であることがわかった。

(2)PPL-CPC複合体の機能評価

PPL-CPC複合体の抗菌効果への濃度の影響を検討したところ、濃度300ppm以上では抗菌効果を発現せず、100、200ppmにおいて抗菌効果を発揮した。

(3)PPL-CPC複合体の構造解析

1,000ppmの複合体は濁りを生じ、濃度を低くしていくとそれにつれて濁りが解消した。しかし、さらに希釈して100、200ppmに達すると再び濁りを生ずることが分かった。これは、CPCの臨界ミセル濃度が約300ppmであることから、300ppm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、300ppm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していると考えられる。

このことから、300ppm以上の高濃度域ではミセル型の複合体を形成し、CPCがPPLに内包されているために抗菌効果を発揮せず、一方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が複合体から容易に遊離、徐放するために殺菌効果を発揮したと考えられる。

(4)ナノ多孔質シリカを用いた薬剤徐放

NPSへの吸着・放出挙動を調べるため、電荷の異なる色素分子(正電荷・負電荷・中性)水溶液へと浸漬し、徐放させたところ、負電荷・中性分子は2、3日で色素の放出が観察されなくなった。一方、CPCと同じく正電荷を持つ分子のみが2週間以上に渡る色素の徐放が確認された。また、数週間の徐放の後、当該試料を再び色素溶液へと浸漬したところ、初回同様の徐放挙動が観測された。CPC溶液への浸漬時においても同様の挙動が観測された。NPS表面にアミノ基を提示する化学修飾を施した粒子(f-NPS)を用いると、吸着・徐放挙動は逆転した。

これらの結果から、歯科用材料に含有したキャリア材料を用いた薬剤吸着・徐放・リチャージに成功した。またキャリア材料への表

面化学修飾により簡便にあらゆる電荷の薬剤についても徐放が可能であることが示された。

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 22 件)

- 1) Y. Bando, K. Nakanishi, S. Abe, S. Yamagata, Y. Yoshida, and J. Iida, "Electric charge dependence of controlled dye-release behavior in glass ionomer cement containing nano-porous silica particles", *J. Nanoscience and Nanotechnology*, (in press) (査読有)
- 2) K. Nakamura, S. Abe, H. Minamikawa, Y. Yawaka, "Effect of fluoride-releasing fissure sealants on enamel demineralization", *Pediatric Dental J.* (in press) (査読有)
- 3) M. Tagaya, S. Abe, S. Motozuka, K. Shiba, T. Takemura, I. Hayashi, and Y. Sakaguchi, "Surface-engineered mesoporous silica particles with luminescent, cytocompatible and targeting properties for cancer cell imaging", *RSC Advances*, 7, 2017, 13645-13654 (査読有)
DOI: 10.1039/c7ra00535k
- 4) S. Yoshizawa, S. Abe, M. Mutoh, T. Kusaka, M. Nakamura, Y. Yoshida, J. Iida, H. Kawabata, and H. Tachikawa, "Density functional theory (DFT) study on oligosilane-functionalized C₆₀ fullerene", *Japanese J. Applied Physics*, 56, 2017, 01AE0301-04 (査読有)
DOI: 10.7567/JJAP.56.01AE03
- 5) M. Mutoh, S. Abe, T. Kusaka, M. Nakamura, Y. Yoshida, J. Iida, and H. Tachikawa, "Density functional theory (DFT) study on ternary interaction system of fluorinated ethylene Carbonate, Li⁺, and graphene model", *ATOMS*, 4, 2016, 401-408 (査読有)
DOI: 10.3390/atoms4010004
- 6) K. Nakanishi, S. Yamagata, T. Akasaka, S. Abe, Y. Yoshida, and J. Iida, "Development of poly(L-lactic acid)/organically modified montmorillonite nanocomposites for the fabrication of orthodontic anchoring screws", *J. Nanoscience Nanotechnology*, 16, 2016, 9292-9297, (査読有)
DOI: 10.1166/jnn.2016.12917
- 7) T. Takada, Takuma Baba and S. Abe, "Simple process for sidewall modification of multi-walled carbon nanotubes with polymer side chain radicals generated by ultraviolet-induced C-Cl bond dissociation of polystyrene derivatives" *J. Carbon Res.*, 2, 2016, 2001-2011, (査読有)
- 8) T. Akasaka, H. Miyaji, N. Kaga, A. Yokoyama, S. Abe, and Y. Yoshida "Adhesion of osteoblast-like cells (Saos-2) on micro-/submicro-patterned apatite scaffolds fabricated with apatite cement paste by micro-molding", *Nano Biomedicine*, 8, 2016, 112-122 (査読有)
- 9) S. Abe, S. Kawano, Y. Toida, M. Nakamura, S. Inoue, Y. Yoshida, H. Sano, H. Kawabata, and H. Tachikawa, "Electronic States of Alkyl Radical-Functionalized C₂₀ Fullerene: Density Functional Theory (DFT) Study", *Japanese J. Applied Phys.*, 55, p03DD0301-04, (2016) (査読有)
DOI: 10.7567/JJAP.55.03DD03
- 10) S. Abe, E. Seitoku, N. Iwadera, Y. Hamba, S. Yamagata, T. Akasaka, T. Kusaka, S. Inoue, Y. Yawaka, J.-i. Iida, H. Sano, T. Yonezawa, and Y. Yoshida, "Estimation of biocompatibility of nano-sized ceramic particles with osteoblasts, osteosarcomas and hepatocytes by static and time-lapse observation", *J. Biomedical Nanotechnology*, 12, 472-480 (2016) (査読有)
DOI: 10.1166/jbn.2016.2190
- 11) M. Mutoh, S. Abe, T. Kusaka, M. Nakamura, Y. Yoshida, J. Iida, and H. Tachikawa, "Density functional theory (DFT) study on ternary interaction system of fluorinated ethylene carbonate, Li⁺, and graphene model", *ATOMS*, 4, p401-408 (2016) (査読有)
DOI: 10.3390/atoms4010004
- 12) E. Seitoku, S. Abe, T. Kusaka, M. Nakamura, S. Inoue, Y. Yoshida and H. Sano, "Cytocompatibility of HeLa cells to nano-sized ceramics particles", *J. Nanoscience and Nanotechnology*, 16, p3373-3377, (2016) (査読有) DOI: 10.1166/jnn.2016.12309
- 13) T. Takada, T. Baba, and S. Abe, "Simple process for sidewall modification of multi-walled carbon nanotubes with polymer side chain radicals generated by ultraviolet-induced C-Cl bond dissociation of polystyrene derivatives", *J. Carbon Research*, 20, 2001-2011, (2016) (査読有)
- 14) N. Kiyama, S. Abe, S. Yamagata, Y. Yoshida, and J. Iida, "Evaluation of the biocompatibility of ceramic nanoparticles with A549 lung epithelial cells",

Nanoscience and Nanotechnology Letters, 8, 310-315 (2016) (査読有)

DOI: 10.1166/nml.2016.2132

- 15) S. Tsuchiya, **S. Abe**, Y. Era, Y. Nakagawa, M. Nakamura, T. Kusaka, **Y. Yoshida**, T. Yonezawa, and J. Iida, "Assessment of size and morphological effects of ceramics nanoparticles on their biocompatibility", *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 8, 329-334 (2016) (査読有)

DOI: 10.1166/nml.2016.2139

- 16) S. Ushimura, K. Nakamura, Y. Matsuda, H. Minamikawa, **S. Abe**, and Y. Yawaka, "Assessment of the inhibitory effects of fissure sealants on the demineralization of primary teeth using an automatic pH-cycling system", *Dental Materials J.*, 35, 316-324 (2016) (査読有)

DOI: 10.4012/dmj.2015-297

- 17) K. Nakanishi, S. Yamagata, T. Akasaka, **S. Abe**, **Y. Yoshida**, and J. Iida, "Development of poly(L-lactic acid)/organically modified montmorillonite nanocomposites for the fabrication of orthodontic anchoring screws", *J. Nanoscience and Nanotechnology*, 16, 9292-9297 (2016) (査読有)
DOI: 10.1166/jnn.2016.12917
- 18) A. Hyono, **S. Abe**, K. Kawai, and T. Yonezawa, "Scanning electron microscope observation of carbon nanotubes with room temperature ionic liquids: effect of their hydrophilicities", *J. Nanoscience and Nanotechnology*, 15, p9272-9274 (2015) (査読有)
DOI: 10.1166/jnn.2015.11409
- 19) Y. Konno, **S. Abe**, and T. Takada, "Firm attachment of carboxylated multi-walled carbon nanotubes onto amino-functionalized glass surface through ionic interaction", *Tanso*, 266, p7-10 (2015) (査読有)
DOI: 10.7209/tanso.2015.7
- 20) S. Ting, F. Pan, J. Fu, S. Kakuda, S. Hoshika, T. Ikeda, Y. Nakaoki, **S. Abe**, **Y. Yoshida** and H. Sano, "Effect of different remaining dentin thickness on Micro-tensile bond strength of current adhesive systems", *Dent. Mater. J.*, 34, p181-188 (2015) (査読有)
DOI: 10.4012/dmj.2014-130
- 21) M. Mutoh, **S. Abe**, K. Nakayama, S. Yoshizawa, M. Nakamura, T. Kusaka, **Y. Yoshida**, J. Iida, and T. Takada, "Simple size-controlled preparation of micro-/nano-sized fullerene C₆₀ particles

using different chain-length diaminoalkane compounds", *Nano Biomedicine*, 7, p87-92 (2015) (査読有)

DOI: 10.3390/atoms4010004

- 22) M. Mutoh, **S. Abe**, A. Hyono, H. Matsuura, K. Nakanishi, K. Kawai, M. Nakamura, S. Inoue, **Y. Yoshida**, J. Iida, and T. Yonezawa, "Electroconductive pretreatment of several types of non-conductive wet biological samples for SEM using a room temperature ionic liquid: Simple and rapid conductive preparation", *Nano Biomedicine*, 7, p72-80 (2015) (査読有)

〔学会発表〕(計 17 件)

- 1) 成徳英理, **阿部薫明**, 吉田靖弘, 佐野英彦, "バイオ応用を目指したセラミクスナノ粒子の細胞適合性の評価", 化学系学協会北海道支部 2017 年冬季研究発表会, 札幌, 2017.1
- 2) 江良裕子, **阿部薫明**, 吉田靖弘, "イオン液体を用いた生体湿潤試料 SEM 観察の迅速・簡便前処理法" 化学系学協会北海道支部 2017 年冬季研究発表会, 札幌, 2017.1
- 3) **S. Abe**, S. Tsuchiya, Y. Era, Y. Nakagawa, E. Seitoku, H. Sano, J. Iida, and Y. Yoshida, "In vitro study of biocompatibility of several ceramics particles on cells", AsianBioceramics 2016 Brisbane, AUSTRALIA, 2016.12
- 4) **阿部薫明**, 成徳英理, 江良裕子, 吉田靖弘, 佐野英彦, "ヒト由来細胞に対するセラミックナノ粒子の生体適合性の検討" 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 福岡, 2016.11
- 5) **S. Abe**, E. Seitoku, Y. Hamba, N. Iwadera, T. Akasaka, S. Yamagata, Y. Yawaka, J. Iida, H. Sano, and Y. Yoshida, "Biocompatibility of several nano-sized ceramics particles: In vitro study", Bioceramics 2016, Charlotte, USA, 2016.11
- 6) Y. Era, **S. Abe**, Y. Nakagawa, A. Hyono, M. Nakamura, and Y. Yoshida, "Cytocompatibility of several nano-sized ceramics particles: In vitro study", The 17th Chitose International Forum on Photonics Science and Technology, Chitose, JAPAN, 2016.11
- 7) E. Seitoku, **S. Abe**, Y. Era, S. Tsuchiya S., Kiyama N., Nakanishi K., Y. Nakagawa, T. Akasaka, J. Iida, Y. Yoshida and H.Sano, "Assessment of cytocompatibility of nano-sized ceramics particle on several cells", International Dental Materials Congress 2016, Bali, INDONESIA, 2016.11
- 8) Y. Era, **S. Abe**, Y. Nakagawa, A. Hyono, M.Nakamura, T. Kusaka, and Y. Yoshida, "Assessment of the cytocompatibility of

- ceramic nanoparticles with several types of cells”, AsiaNANO 2016, Sapporo, JAPAN, 2016. 10
- 9) 成徳英理, **阿部薫明**, “Cytocompatiblity of nano-sized ceramics particles on several cells”, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 札幌, 2016.8
- 10) **S. Abe**, S. Tsuchiya, Y. Yoshida, and J. Iida, ”Chemical modification on dental orthodontic wire for suppression of metal ions elution”, KJF 2016, Fukuoka, JAPAN, 2016.8
- 11) M. Mutoh, **S. Abe**, S. Yoshizawa, K. Nakayama, T. Kiba, Y. Yoshida, J. Iida, T Takada, “Preparation of size- and shape-controlled water-dispersible fullerene nanoparticles and their application in biological fields”, 第 2 5 回日本 MRS 年次大会, 横浜, 横浜情報文化センター, 横浜市開港記念会館, 万国橋会議センター, 波止場会館, 産業貿易センタービル, 神奈川県民ホール, 横浜マリンタワー, 2015-12-08 – 2015-12-10
- 12) T. Okihara, **S. Abe**, Y. Okajima, S. Kamenoue, D. Yamamoto, S. Takashiba, Y. Yoshida, “Effective controlled drug release system using phosphorylated pullulans2015”, NanoMED 2015, Manchester, UK, 2015-11-23 – 2015-11-25
- 13) **S. Abe**, N. Iwadera, M. Mutoh, T. Katsurayama, S. Morimoto, K. Nakanishi, J. Iida, and Y. Yoshida, “Cytocompatiblity of nano-sized ceramics particles on several cells”, Boceramics 2015, Bali, INDONESIA, 2015-10-26 – 2015-10-28
- 14) **阿部薫明**, セラミックスナノ粒子の細胞安全性の評価, 日本セラミック協会 第 1 回ナノバイオセラミックによる細胞機能制御テクノロジー研究会, 長岡, アオーレ長岡, 2015-08-21 招待講演
- 15) S. Tsuchiya, N. Kiyama, **S. Abe**, T. Kiba, A. Murayama, J. Iida, and Y. Yoshida, “Interaction of Alkyl Radicals with Fullerene (C₆₀): Density Functional Theory (DFT) Study”, Nano Korea 2015, Seoul, KOREA, 2015-07-01 – 2015-07-03
- 16) **S. Abe**, M. Mutoh, K. Nakayama, K. Nakamura, T. Kusaka, Y. Yoshida, J. Iida, and T. Takada, “Preparation of surface-modified fullerene C₆₀ microparticles”, Nano Korea 2015, Seoul, KOREA, 2015-07-01 – 2015-07-03
- 17) **S. Abe**, S. Kawano, Y. Toida, S. Inoue, H. Sano, Y. Yoshida, and H. Tachikawa, “Interaction of Alkyl Radicals with Fullerene (C₆₀): Density Functional Theory (DFT) Study”, M & BE 2015, Tokyo, JAPAN, 2015-06-22 – 2015-06-25

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 件)

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

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.den.hokudai.ac.jp/seitaizai/ryou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 薫明 (ABE Shigeaki)
 北海道大学大学院歯学研究院・助教
 研究者番号 : 40374566

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

吉田 靖弘 (YOSHIDA Yasuhiro)
 北海道大学大学院歯学研究院・教授
 研究者番号 : 90281162

(4) 研究協力者

()