

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870374

研究課題名(和文) ホスト-ゲスト相互作用の制御に基づく超音波応答性を示すナノゲルの開発

研究課題名(英文) Development of nanogels showing ultrasound-responsivity based on control of the host-guest interaction

研究代表者

井澤 浩則 (Izawa, Hironori)

鳥取大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50643235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：超音波応答型ドラッグデリバリーシステムを指向してシクロデキストリン(CD)を高分子ネットワーク内に含むゲル微粒子を創製し超音波に対する応答性を評価した。CDを高分子ネットワーク内に含むキトサンナノ粒子(CD架橋型ナノ粒子)とCDをグラフト化しただけのCDグラフト化キトサンからなるナノ粒子(比較ナノ粒子)を合成し、モデル薬物を用いて超音波応答性を評価した。その結果、比較ナノ粒子は、超音波照射の有無で放出挙動に変化は見られなかったが、CD架橋型ナノ粒子は、遅延放出効果を示すことが分かった。また、本研究において得られたCDグラフト化キトサンと抗がん剤を複合化したナノ粒子を調製することにも成功した。

研究成果の概要(英文)：The host-guest interaction of cyclodextrin (CD) involved in a polymeric network would be controlled by an ultrasound because the energy from the ultrasound can be transferred through the polymeric network. In this study, we investigated preparation of a nano-particle composed of the polymeric network containing CD in response to the ultrasound. The nano-particle was prepared by crosslinking of a chitosan by using a tri-substituted carboxymethyl beta-CD. A particle composed of beta-CD-grafted chitosan and tripolyphosphate was prepared as a comparison sample to clarify the importance of the network structure. The release experiment with rhodamine 6G revealed that the nano-particle having the CD-containing polymeric network showed a sustained release by the exposure to the ultrasound, which was 4 folds delayed as compared to spontaneous release. We further successfully prepared nanoparticles composed of CD-grafted chitosan/doxorubicin conjugate.

研究分野：高分子化学

キーワード：キトサン シクロデキストリン ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

(1) シクロデキストリン (CD) は環状構造を有する 6, 7, 8 糖からなるマルトオリゴ糖であり、それぞれ  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CD と呼ばれる。CD は環の内部空間に適したサイズの疎水性分子を取り込み、包接錯体を形成する。申請者は、 $\beta$ -CD を架橋点に有するアルギン酸カルシウムヒドロゲルが、マクロな力 (圧縮) に応答して薬物を放出することを見出した。このような現象は、CD がグラフト化されているゲルでは見られず、CD を架橋点に有するゲルのみに見られることも分かった。つまり、薬物放出には、外部応力が主鎖を通じて CD に伝わるネットワーク構造が重要であることが明らかになった。第一原理計算により、薬物放出のメカニズムについて研究したところ、圧縮によって CD 部位に摂動が生じ、安定な包接状態を保てなくなることが推測された。

(2) 超音波を医療分野に用いる試みは、腹部・心エコーなどの診断分野はもとより、治療分野においても行われている。特にガン治療の分野では、超音波によって発生する局所熱の抗癌への利用や、それと DDS とを組み合わせるガン治療が提案されている。申請者が見出した CD を架橋点に有する分子構造は、超音波のエネルギー (物理的な波) も主鎖を介して CD に伝えることができるので、超音波応答型の DDS に応用できると期待されるが、その分子構造の超音波に対する応答性はまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) 超音波は、バルクな力より大きなエネルギーを分子に継続的に与えることができるので、より鋭敏な薬物放出挙動を見せると期待される。本研究では、超音波応答型 DDS への応用を指向して CD を架橋点に有するナノゲル (50 ~ 200 nm) を  $\beta$ -CD とキトサンから創製し、超音波に対する応答性を評価することを目的とした。また、分子構造の効果を明確にするために、 $\beta$ -CD をキトサンにグラフト化した  $\beta$ -CD グラフト化キトサン ( $\beta$ -CD-g-CS) を比較サンプルとして合成し、その超音波応答性を比較した。

(2) 比較サンプルである CD-g-CS は、DDS に有効な素材である。従来、 $\beta$ -CD-g-CS の合成には、5 段階の合成ステップと煩雑な単離操作が必要であったが、本研究ではカルボキシメチル化反応を利用することで、二段階で簡便に  $\beta$ -CD-g-CS を合成することに成功した。そこで、CD-g-CS のがん治療への応用を指向して、抗がん剤であるドキシソルピシン (Dox) との複合化も併せて検討した。

3. 研究の方法

(1) カルボキシメチル化反応によってカルボキシル基を複数有する  $\beta$ -CD 架橋剤を調製した。 $\beta$ -CD 架橋剤とキトサンをエチル(ジメ

チルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) と *N*-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) を用いる脱水縮合反応にて架橋した。目的の粒径のナノゲルが得られるよう、原料比 (キトサン/ $\beta$ -CD 架橋剤) と反応濃度の最適化を行った。また、比較実験用ナノゲルは、 $\beta$ -CD-g-CS をトリポリリサン (TPP) にてイオン架橋することで調製した。粒径は動的光散乱 (DLS) にて確認した。生成物の同定は IR、NMR にて行った。

(2) 超音波発生装置 (BRANSON SLPe 40) を用いて超音波応答性を評価した。超音波によって発生する熱を排除するために、クールスターラーを用いて溶液温度を 25 に保った。ナノ粒子をローダミン 6G 水溶液に浸漬することで、ローダミン 6G をナノ粒子内に取り込み、遠心分離にてナノ粒子を分離した。リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中でローダミン 6G の放出実験を行った。超音波照射は、0, 1, 2, 3, 4, 5 時間後に各々 30 分間照射した。ローダミン 6G の取り込み量及び放出量は、525 nm における溶液の吸光度から検量線を用いて算出した。

4. 研究成果

(1)  $\beta$ -CD 架橋剤として平均置換度を約 3 に調整したカルボキシメチル化  $\beta$ -CD (CM- $\beta$ -CD) の調製を行った。 $\beta$ -CD 架橋剤の生成及び平均置換度の確認には  $^1\text{H}$  NMR スペクトル及び MALDI-TOF MS スペクトルを用いた。 $^1\text{H}$  NMR スペクトルでは、カルボキシメチル基が導入されたグルコースユニットの 1 位のプロトンに由来するシグナル (B) が確認された (図 1)。未反応のユニット由来のシグナル (A) との積分比から平均導入率を算出したところ、平均置換度化度は 2.87 と見積もられた。また、MALDI-TOF MS スペクトルでは、三置換の CM- $\beta$ -CD の分子量 ( $\text{CM}_3$ - $\beta$ -CD+ $\text{Na}^+$ ) と一致する 1398 (m/z) に主要なピークが見られた。これらの結果から、 $\beta$ -CD 架橋剤の生成が確認された。

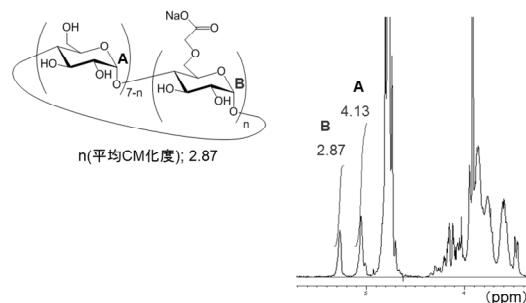


図 1 . CD 架橋剤の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル.

(2) CD 架橋剤を用いて  $\beta$ -CD 架橋型キトサンナノ粒子の調製を行った。ここでは、0.1 M MES 緩衝液中での EDC と NHS を用いる脱水縮合反応にて、 $\beta$ -CD 架橋剤とキトサンとの架橋反応を行った。DLS にて測定した粒径分布では、平均粒径 122.5 nm 及び 351.9 nm にピー

クが確認された (図 2)。これらは、それぞれ、架橋反応によって生じたナノ粒子及び二次粒子であると考えられる。このことから、DDS に適した粒径の微粒子の調製に成功したことが確認された。上記の反応による共有結合形成を確認するために、IR スペクトルを測定した。IR スペクトルでは、アミドに由来する  $1650\text{ cm}^{-1}$  及び  $1530\text{ cm}^{-1}$  の吸収ピーク強度の向上が見られた。このことから、共有結合による架橋反応が確認された。分子構造による超音波応答性への影響を調べるために、 $\beta$ -CD をキトサンにグラフト化した  $\beta$ -CD-g-CS の合成も行った。構造確認は  $^1\text{H NMR}$  にて行った。図 3 に見られるように、それぞれのシグナルを明確に帰属できたことから、 $\beta$ -CD-g-CS の生成が確認された。また、この反応は、ほぼ定量的に反応が進行することも分かった。このことから、 $\beta$ -CD 架橋型キトサンナノ粒子においても、同様に定量的に架橋反応が起こっていることが推測された。キトサンは TPP とポリイオンコンプレックスを形成し、ナノ粒子を形成することが知られている。そこで、TPP と  $\beta$ -CD-g-CS との複合化による比較サンプルの創製を検討した。TPP の添加によって生成した粒子の粒径を DLS により測定したところ、平均粒径は  $258\text{ nm}$  であり、 $\beta$ -CD 架橋型キトサンナノ粒子と同程度の粒径の比較サンプルが得られたことが分かった。

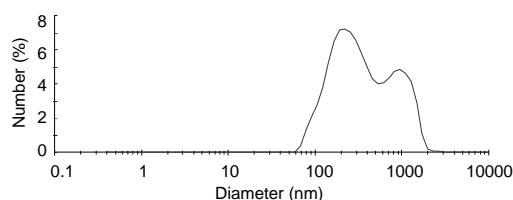


図 2 .  $\beta$ -CD 架橋型キトサンナノ粒子の粒度分布 .

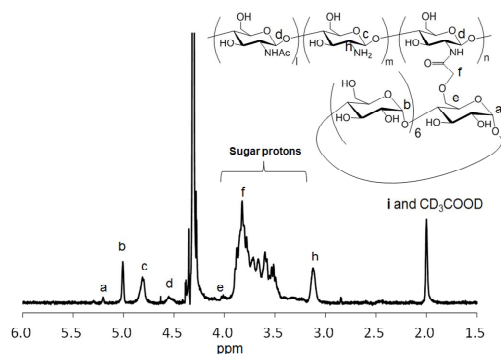


図 3 .  $\beta$ -CD-g-CS の  $^1\text{H NMR}$  スペクトル .

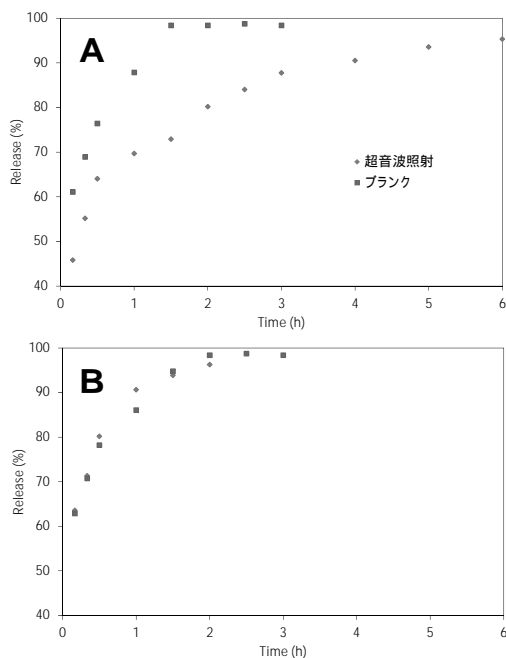
( 3 ) 分析が容易なモデル薬物として、色素であるローダミン 6G を用いて  $\beta$ -CD 架橋型キトサンナノ粒子及び比較サンプルの包接能力を評価した。 $\beta$ -CD 架橋型キトサンナノ粒子及び比較サンプル存在下でのローダミン 6G の蛍光スペクトル測定を行った。 $\beta$ -CD 架橋型キトサンナノ粒子及び比較サンプル存在下

では、 $\beta$ -CD 存在下と同程度の蛍光強度の低下が見られた。この消光挙動に着目し、Benesi-Hildebrand プロットから結合定数を算出したところ、 $\beta$ -CD 架橋型キトサンナノ粒子では  $213\text{ M}^{-1}$ 、比較サンプルでは  $251\text{ M}^{-1}$  と見積もられた。 $\beta$ -CD とローダミン 6G の結合定数は、 $312\text{ M}^{-1}$  であったことから、架橋点の増加によって CD 付近の立体が込み合い結合定数の低下が起こることが示唆された。しかし、CD の包接能力は概ね保持していることが確認された。

( 4 ) 図 4 A は、 $\beta$ -CD 架橋型キトサンナノ粒子の放出実験結果である。超音波照射を行わないブランクでは、1.5 時間後にモデル薬物の放出が終了するのに対して、超音波照射を行うと驚くべきことに、放出終了までに 6 時間の時間を要し、約 4 倍の遅延放出効果を示すことが分かった。一方で、CD をグラフト化しただけの比較サンプル ( 図 4 B ) では、遅延放出効果は確認されなかった。これらの結果から、CD を分子内に含む高分子ネットワークに超音波照射を行うと、錯体がより安定化すること示唆された。この現象を確かめるために、超音波照射下におけるローダミン 6G の粒子内への取り込み量の変化を吸光度から測定した。ここでは、調製したナノ粒子に  $\beta$ -CD 部位と等モルのローダミン 6G を添加して、25 で 3 時間超音波照射を行った。超音波照射なしでの架橋型キトサンナノ粒子のローダミン 6G の取り込み量は、 $16.4\%$  であるのに対して、超音波照射下では、 $28.8\%$  と取り込み量が約 2 倍向上することが分かった。また、このような現象は、CD を高分子ネットワークに含む構造を持たない比較サンプルでは見られなかった。以上の結果から、本研究では、超音波照射による放出促進を期待したが、全く逆の現象が起こることが分かった。これは、筆者らが以前に報告したバルクな力では、CD に摂動が生じ錯体が不安定化したのに対して、超音波照射では、バルクな力よりもはるかに高いエネルギーが供給されることで、錯体がより安定な状態に変化したと考えられた。

( 5 ) 今回の結果を逆転の発想で考えれば、完全に包含するカプセル型の DDS と異なり、包接型の CD では逆に体内中で薬物を送達中に自然放出してしまう問題を払拭できる技術となりうる可能性がある。例えば、初期状態で超音波処理を行い CD の薬物等の内包物の包接 ( 拘束 ) 力を強化することができれば、自然放出を極限まで抑えた状態で体内の隅々までデリバリーが実現されることが期待できる。またデリバリー中に何らかのマクロ的な力を患部に負荷できれば最善の DDS 方法となりうるということが想定される。

図 4 .  $\beta$ -CD 架橋型キトサンナノ粒子 ( A ) と



比較サンプル (B) を用いたローダミンの放出実験。

(6) 次に、比較サンプルとして合成に成功した CD-g-CS の DDS への応用を検討した。 $\alpha$  及び  $\gamma$ -CD を用いて  $\beta$ -CD と同様に CD-g-CS の合成を試みた。 $\gamma$ -CD を用いた場合は、 $\beta$ -CD と同様な導入率と収率で  $\gamma$ -CD-g-CS が得られたが、 $\alpha$ -CD では、導入率の著しい低下が見られた。これは  $\alpha$ -CD が EDC を包接して反応を阻害したことが原因と考えられたので、EDC の添加量を 4 等量に増やした。その結果、導入率の改善が見られた。これらの結果から、本手法は、全ての汎用性の CD に有効であることが分かった。

(7)  $\alpha$ 、 $\beta$ 、及び  $\gamma$ -CD-g-CS と抗がん剤であるドキソルピシン (Dox) との複合体形成を検討した。複合体形成を確認するために Dox と  $\alpha$ -、 $\beta$ - 又は  $\gamma$ -CD-g-CS の  $^1\text{H}$  NMR 測定を  $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$  溶液で行った。その結果、 $\gamma$ -CD-g-CS に顕著なピークシフトが見られた。CD 濃度を変えて同様に実験を行い、Benesi-Hildebrand プロットから結合定数を算出した結果、 $171.5 \text{ M}^{-1}$  と見積もられた。この値は  $\gamma$ -CD と Dox との結合定数とほぼ一致したことから、 $\gamma$ -CD-g-CS の CD 部位はグラフト化後も同様な包接能力を有することが明らかになった。

(8) Dox 存在下で CS 及び  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -CD-g-CS と TPP によるナノ粒子を創製し、Dox の取り込み量を調査した。その結果、取り込み量は、CS 及び  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -CD-g-CS で、それぞれ 17.0、17.1、20.2、28.6% であり、Dox を包接できる  $\gamma$ -CD-g-CS でより高い値を示した。

(9) 簡便に合成できる  $\gamma$ -CD-g-CS が抗がん剤である Dox と包接を介して良好に結合する

ことが分かった。 $\alpha$ -及び  $\beta$ -CD-g-CS も薬物の種類によって良好な包接錯体を形成すると考えられ、今後、DDS 素材として応用展開できると期待される。CD-g-CS は、さらなる構造改変が可能であることから、薬物との結合能力の強化、部位特異的なリガンドの導入、細胞膜透過性の強化などさらなる機能化が期待される。

< 引用文献 >

H. Izawa et al. *J. Mater. Chem. B*, **2013**

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計4件)

Hironori Izawa、Yuka Miyazaki、Shinsuke Ifuku、Minoru Morimoto、Hiroyuki Saimoto、Fully bio-based oligophenolic nanoparticle prepared by horseradish peroxidase-catalyzed polymerization、*Chemistry Letters*、査読有、印刷中  
DOI : 10.1246/cl.160205

Hironori Izawa、Keisuke Yamamoto、Satoshi Yoshihashi、Shinsuke Ifuku、Minoru Morimoto、Hiroyuki Saimoto、Facile preparation of cyclodextrin-grafted chitosans and their conversion into nanoparticles for anticancer drug delivery system、*Polymer Journal*、査読有、48 巻、2016、203-207  
DOI : 10.1038/pj.2015.90

Hironori Izawa、Noriko Okuda、Shinsuke Ifuku、Minoru Morimoto、Hiroyuki Saimoto、Orlando J. Rojas、Bio-based wrinkled surfaces harnessed from biological design principles of wood and peroxidase activity、*ChemSusChem*、査読有、8 巻、2015、3892-3896  
DOI : 10.1002/cssc.201500819

Hironori Izawa、Shoji Nishino、Masato Sumita、Kenji Morihashi、Shinsuke Ifuku、Minoru Morimoto、Hiroyuki Saimoto、A novel 1,8-Naphthalimide derivative with an open space for an anion: Unique fluorescence behaviour depending on the binding anion's electrophilic property、*Chemical Communications*、査読有、51 巻、2015 年、8596-8599  
DOI : 10.1039/C5CC01709B

(学会発表)(計11件)

井澤浩則、奥田記子、伊福伸介、森本稔、齋本博之、第 24 回ポリマー材料フォーラム、タワーホール船堀(東京)、樹木に学ぶ微細構造フィルムの創製、2015 年 11 月 26-27 日

井澤浩則、樹木の細胞壁に学ぶバイオベースリンクルフィルムの創製(招待講演)、日本化学会中国四国支部大会 若手特別講演、岡山大学津島キャンパス、2015 年 11 月 14-15 日

井澤浩則、奥田記子、伊福伸介、森本稔、齋本博之、樹木に倣った新規リンクル表面形成システム、第 64 回 高分子討論会、東北大学 川内キャンパス、2015 年 9 月 15-17 日

井澤浩則、樹木に学ぶ新規リンクル形成システムによるキトサンフィルム表面への微細構造の構築(依頼講演)第 29 回 キッチン・キトサン学会大会 シンポジウム講演『キッチン・キトサンマテリアル及びオリゴ糖利用の新潮流』、東海大学熊本キャンパス、2015 年 8 月 21-22 日

吉橋雅、井澤浩則、伊福伸介、森本 稔、齋本博之、N-硫酸化シクロデキストリングラフトキトサンの調製、第 29 回キッチン・キトサン学会大会 東海大学熊本キャンパス、2015 年 8 月 21-22 日

奥田記子、井澤浩則、伊福伸介、森本稔、齋本博之、樹木に倣う天然資源からのリンクルフィルムの創製、第 22 回セルロース学会年次大会、北海道大学 学術交流会館、2015 年 7 月 9-10 日

井澤浩則、奥田記子、伊福伸介、森本稔、齋本博之、ミクロ構造表面を有する樹木規範キトサンフィルムの創製(英語講演)第 64 回 高分子学会年次大会、札幌コンベンションセンター、2015 年 5 月 27-29 日

井澤浩則、伊福伸介、森本 稔、齋本博之、シクロデキストリングラフトキトサンの簡易調製と抗がん剤との複合体形、第 64 回高分子学会年次大会、札幌コンベンションセンター、2015 年 5 月 27-29 日

Hironori Izawa、Preparation of microstructured-chitosan films inspired from a wood (招待講演) Korea-Japan Joint Symposium: Sustainable Plastics and Biopolymers、Daejeon convention center( Daejeon、韓国) 2015 年 4 月 9-10 日

井澤浩則、奥田記子、伊福伸介、森本稔、齋本博之、Wood-inspired film with a micro-structured surface (英語講演)、日本化学会第 95 回春季年会、日本大学 船橋キャンパス、2015 年 3 月 26-29 日

吉橋雅、井澤浩則、伊福伸介、森本 稔、齋本博之、簡便なシクロデキストリングラフトキトサンの合成、第 28 回キッチン・キトサンシンポジウム、順天堂大学 本郷キャンパス、2014 年 8 月 7-8 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：表面に微細構造を有するキトサンフィルムの製造方法およびそれを用いて製造されたキトサンフィルム  
発明者：井澤浩則、伊福伸介、森本 稔、

齋本博之

権利者：鳥取大学

種類：特許

番号：特願 2015-12599

出願年月日：2015 年 1 月 26 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

無し

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井澤 浩則 (IZAWA, Hironori)

鳥取大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：50643235

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し