

学位論文要旨

学位申請者氏名 内田 亘

(MS 明朝、10.5 ポイント、2 頁：図表は不可)

ポリビニルアルコール (PVA)、 γ -シクロデキストリン (CyD)、フェニルボロン酸 (PBA) を用いて、ポリオール化合物 (糖、カテコールなど) の存在にตอบสนองして崩壊するハイドロゲル (PBA-CyD/PVAgel) を調製した。PBA-CyD/PVAgel の内部に封入された薬物は、フルクトース、グルコース存在下においてその放出が促進された。

ハイドロゲルは、鎖状高分子同士を架橋し、三次元網目構造を形成させることで調製できる。その特性は、主鎖となる鎖状高分子と溶媒間での相互作用や架橋構造様式などに依存する。本研究では、鎖状高分子に PVA (重合度 500)、架橋点に γ -CyD と PBA を用いた。 γ -CyD と PBA は PVA に対して異なった相互作用を示す。環状オリゴ糖である γ -CyD は、PVA をその空孔内へ包接し、包接複合体を形成する。PBA は、シスジオール構造を持つ化合物とエステル結合を形成する特性があり、シスジオール構造を持つ PVA に対してエステル結合を形成する。この二つの相互作用により PVA 同士を架橋したハイドロゲルの形成を図った。また、このハイドロゲルには PBA の特性が付与されているものと期待し、ポリオール化合物存在下における封入した薬物の放出を観察した。

ハイドロゲルを調製するにあたり、 γ -CyD に対して PBA を一分子だけ化学修飾させた PBA-CyD を合成した。PBA-CyD はその構造内に CyD 部位と PBA 部位を一つずつ持ち合わせ、PVA と混合した際には各部位で異なった相互作用を示し、PVA 同士を架橋すると予想した。20°C 下で PVA と PBA の水溶液を混合することでハイドロゲルの調製を図ったが、混合した直後に白く濁り始め、塊になった。PVA は PVA 間の水素結合によってハイドロゲルを形成し得るが、水溶液がゲル化するには上記の温度条件では困難であると考えられ、PBA-CyD の存在が塊の形成に関与していると考えられた。更に、そこに関与しているのは PVA に対して相互作用を示す PBA-CyD の PBA 部位と CyD 部位であると考えられ、得られた塊は想定していた架橋構造によって PVA が架橋された目的物質の PBA-CyD/PVAgel であると推測された。

調製した塊が目論見通り、PBA-CyD の CyD 部位と PVA 間における包接複合体の形成と PBA 部位と PVA 間におけるエステル結合により成立した PBA-CyD/PVAgel であることを確認した。PVA と PBA-CyD の混合物内に存在し得るハイドロゲル形成に関わる相互作用は、①PVA 同士間における相互作用、②PVA と CyD 部位間における相互作用、③PVA と PBA 部位間における相互作用の三つであると予想した。そこで、これら三つの相互作用の存在を種々の測定方法により確認することでハイドロゲルの架橋構造を推測した。結果、①示差走査熱量測定において、PVA 同士間における水素結合に起因する吸熱ピークが観察されなかったことから、PVA 同士間における相互作用は存在しないか極めて小さいこと、②固体サンプルを用いた ^{13}C -NMR スペクトル測定において、 γ -CyD のスペクトルと比較してピークの分裂が解消されたこと、及び PVA 由来のピークが PBA-CyD/PVAgel のスペクトル上では低磁場シフトしていたことから、PVA と CyD 部位間で包接複合体形成が示唆されたこと、③PBA-CyD/PVAgel (凍結乾燥品) の懸濁液が各種ポリオール化合物 (カテコール、フルクトース、グルコース) の存在によってその濁りが減少し、その減少速度が PBA とポリオール化合物間の結合定数に依存していたことから、PVA と PBA 部位間の結合の存在が確認されたこと、などを総合的に判断し、想定していた架橋構造が概ね妥当

なものであることを確認した。

PBA-CyD/PVAgel には、ポリオール化合物存在下において崩壊する刺激応答性が備わっていることが確認され、そこから、PBA-CyD/PVAgel 内に薬物を封入すれば、糖類の存在を契機にした糖類応答性薬物放出促進が成立すると期待した。モデル薬物にはフルオレセインナトリウム (FNa) を用い、PBA-CyD/PVAgel 調製に用いる PBA-CyD 水溶液へ溶解させることで封入した。バイアル内に FNa を含有した PBA-CyD/PVAgel を調製し、そこへフルクトース (100 mM)、もしくはグルコース (100 mM) 水溶液 (HEPES 緩衝液、pH7.4) を添加して 37°C 条件下で放出実験を開始した。得られた FNa 放出プロファイルから Higuchi 式を用いて PBA-CyD/PVAgel 内における放出初期の FNa の拡散係数を算出した。結果、フルクトース存在下においては、放出初期から大きな拡散係数を示し、4 時間目において放出率はほぼ 100% に達し、更に PBA-CyD/PVAgel は完全に溶解していた。これは PBA の PVA に対する結合がフルクトースへ置換されることでゲルの網目構造が大きく変化し、その後崩壊して封入されていた FNa がすべて溶出されたためと考えられた。一方で、グルコース存在下においては顕著な放出促進は認められず、実験後 PBA-CyD/PVAgel は残存していた。この差は PBA に対する結合能の差に起因していると考えられ、結合能が強いフルクトースのようなポリオール化合物については顕著な応答が得られると予想された。結合能が弱いグルコースについては、グルコースオキシダーゼ (GOx) によるグルコース処理能力と PBA が持つ過酸化水素応答性を併用することで、間接的にグルコース応答を得た。GOx はグルコースをグルコン酸へ変換する際に過酸化水素を生成し、PBA は過酸化水素によってボロン酸部分が解離される。つまり、GOx によって発生した過酸化水素により、PVA との結合に重要な PBA のボロン酸部分を解離させることによって PBA-CyD/PVAgel を崩壊に導くと考えられた。FNa と GOx を溶解した PBA-CyD 溶液を用いて PBA-CyD/PVAgel を調製し、グルコース (1, 5, 10 mM)、フルクトース (10 mM) 溶液を添加して放出実験を行ったところ、グルコース濃度 5~10 mM においてゲル内の拡散係数上昇、実験後のゲルの溶解、FNa 放出促進が観察され、一方フルクトース濃度 10 mM では放出促進は観察されなかった。

本研究で調製した PBA-CyD/PVAgel は、PVA と PBA を化学修飾した γ -CyD で構成されており、それが PVA に対して CyD 部位と PBA 部位各々で異なる相互作用を示し、PVA 同士を架橋している。このような架橋構造をもつハイドロゲルの報告は無く、新しい構造を持つハイドロゲルとして提唱できる。PBA-CyD/PVAgel は PBA に対して強く結合するポリオール化合物の存在に応答して崩壊する特性を持ち、内部に封入した薬物を速やかに放出する。PBA への結合が弱いグルコースに関しては、GOx の酵素反応と PBA の過酸化水素応答性を併用することにより 5~10 mM の範囲で応答が得られ、薬物放出の促進が観察された。この応答機構が成立することから、理論上過酸化水素を生成するような酸化酵素を用いれば、その基質に対して選択的で顕著な応答が得られると期待できる。以上から、我々は様々な分子をターゲットにし得る刺激応答性薬物担体やセンサー分子などへの利用を期待できる機能性材料を新規に調製することに成功した。

学位論文要旨

学 位 申 請 者 氏 名 Wataru Uchida

(MS 明朝、10.5 ポイント、2 頁 : 図表は不可)

PBA-CyD/PVAgel which was hydrogel with novel structure was prepared consisting of polyvinyl alcohol (PVA), γ -cyclodextrin (γ -CyD) and phenylboronic acid (PBA), and it is disintegrated by presence of polyol compounds (fructose, glucose and catechol). Drugs, were encapsulated in PBA-CyD/PVAgel, was rapidly released in presence of fructose and glucose.

Hydrogel can be prepared by crosslinking chainlike polymers with some mechanism and forming three-dimension structure. In this study, we used PVA (polymerization degree about 500) as main chain, γ -CyD as crosslink point and PBA as crosslink point. γ -CyD and PBA show different interactions with PVA. γ -CyD, cyclic oligosaccharide, forms inclusion complex by including PVA in the cavity. PBA has property forming ester bond with *cis*-diol compound, so forms ester bond with *cis*-diol like structure in the PVA. We planned to prepare hydrogel by these interactions, and expected it has PBA properties, so observed to release of encapsulated drugs in presence of sugar.

In preparing the PBA-CyD/PVAgel, PBA-CyD which one molecule of PBA was chemically modified for γ -CyD was synthesized. PBA-CyD had one CyD moiety and one PBA moiety, and when mixed with PVA, it showed different interaction at each moiety and expected to cross-link PVA. In fact, hydrogels were formed when PBA-CyD aqueous solution and PVA aqueous solution were mixed and allowed to stand at 20°C for 14 hours. For water soluble PVA to form a hydrogel, it is necessary to crosslink the PVA's with each other. As a factor of formation, there is a possibility that hydrogen bonding between PVA's may be involved in addition to crosslinking by PBA-CyD. However, it is necessary to perform an operation such as freezing and thawing to form hydrogels of PVA. Under the above-mentioned preparation conditions, it is not conceivable that strong hydrogen bonding between PVA's is formed. Furthermore, since gelation proceeds immediately after mixing with the PBA-CyD aqueous solution, it is highly probable that the formed hydrogel is PBA-CyD/PVAgel.

It was confirmed that the prepared hydrogel was PBA-CyD/PVAgel formed by formation of an inclusion complex between the CyD moiety of PBA-CyD and PVA, and ester bonding between PBA moiety and PVA. In this combination of compounds present in the hydrogel system, it was predicted that the interactions involved in hydrogel formation, which can exist in the system, are three: (1) interaction between PVA's, (2) interaction at PVA and CyD moiety, and (3) interaction between PVA and PBA moiety. Therefore, these interactions were confirmed presence by various measuring methods, the crosslinked structure of the hydrogel was estimated. As a result, (1) no endothermic peak due to hydrogen bonding between PVA's was observed in differential scanning calorimetry, there is no interaction or very small interaction between PVA's, (2) in the ^{13}C -NMR spectrum measurement using solid sample, it was confirmed that the splitting of the peak was eliminated as compared with the spectrum of γ -CyD and the peak from PVA shifted low field on the spectrum of PBA-CyD/PVA gel, it was suggested that inclusion complex formation between PVA and CyD moiety, (3) The suspension

of PBA-CyD/PVA gel (lyophilized product) decreases its turbidity due to the addition of various polyol compounds (catechol, fructose, glucose), its rate of decrease depends on the binding constant between PBA and various polyol compound, it was confirmed that there was bond between PVA and the PBA moiety. From the above, it was confirmed that the assumed crosslinking structure was roughly reasonable.

As PBA-CyD/PVA gel disintegrates due to the presence of polyol compound, drug release from drug-encapsulated PBA-CyD/PVA gel can be expected to be promoted in the presence of saccharides. Sodium fluorescein (FNa) was used as a model drug and it was encapsulated by dissolving in PBA-CyD aqueous solution before mixing in the PBA-CyD/PVA gel preparation step. PBA-CyD/PVA gel containing FNa was prepared in vials and release experiments were started by adding fructose (100 mM) or glucose (100 mM) aqueous solution (HEPES buffer, pH 7.4) at 37°C. Based on the obtained FNa release profile, the diffusion coefficient of FNa in PBA-CyD / PVA gel was calculated by the Higuchi equation. As a result, in the presence of fructose, it showed a large diffusion coefficient in the initial release, the release rate reached almost 100% at 4 hours, and PBA-CyD/PVA gel was completely dissolved. It was considered that network structure of the gel changes greatly in the initial as the bond of PBA to PVA is replaced with fructose, finally all encapsulated FNa were released by gel disintegrating. On the other hand, in the presence of glucose, significant release promotion was not observed, and PBA-CyD/PVA gel remained after the experiment. Difference of these results is considered to be due to the difference in binding ability to PBA, and it was predicted that significant release promotion would be obtained for polyol compounds such as fructose, which have strong binding ability. For glucose with weak binding ability, a glucose response was indirectly obtained by using glucose-treating ability by glucose oxidase (GOx) and hydrogen peroxide responsiveness possessed by PBA in combination. GOx produces hydrogen peroxide when converting glucose to gluconic acid, and PBA dissociates the boronic acid moiety by hydrogen peroxide. So, hydrogen peroxide generated by GOx dissociates the boronic acid moiety of PBA, which is important for bonding with PVA, leading to PBA-CyD/PVA gel disintegrate. PBA-CyD/PVA gel was prepared using a PBA-CyD solution mixed with FNa and GOx, and release experiments were carried out by adding glucose (1, 5, 10 mM) and fructose (10 mM) solution. As a result, in the presence of glucose (5, 10 mM), increasing diffusion coefficient of FNa in the gel, dissolution of gel after the experimental and promotion of release of FNa were observed. On the other hand, in the presence of fructose (10 mM), no promotion of release was observed. Since the above response mechanism by GOx is established, it is possible that the oxidase producing hydrogen peroxide may impart selective and remarkable responsiveness to PBA-CyD/PVA gel for its enzyme substrate. From the above, PBA-CyD/PVA gel has a novel structure and exhibits characteristics capable of responding to various compounds, indicating the possibility of using it as a functional material including a drug carrier.

論文審査の結果の要旨

高分子マトリックスは、経皮吸収型製剤や経口固形製剤の機能性基剤として幅広く利用されている。このうち、ハイドロゲルは、鎖状高分子同士を何らかの機構を介して架橋し、三次元網目構造を形成させることで調製できる。その特性は、主鎖となる鎖状高分子と溶媒間での相互作用や架橋構造様式などに依存するので、含有する薬物はその特性に応じて一過的な放出・溶出の制御や放出速度の制御が可能と考えられている。

本研究では、鎖状高分子にポリビニルアルコール（PVA、重合度 500）、架橋点に γ -シクロデキストリン（ γ -CyD）とフェニルボロン酸（PBA）を用いたハイドロゲルの調製が可能か調査し、調製したハイドロゲルが目的とする架橋構造を形成したゲルであるかどうかを確認した。さらに、企図した刺激に対して応答性を示し、モデル薬物のハイドロゲルからの放出が制御可能かを確認した。本研究は、このような刺激応答型のハイドロゲルの調製、機能特性および放出制御を 3 章に分けて評価した。

第 1 章では、ハイドロゲルを調製するにあたり、まず γ -CyD に対して PBA を一分子だけ化学修飾させた PBA-CyD を合成した。NMR 等で確認した PBA-CyD はその構造内に CyD 部位と PBA 部位を一つずつ持ち、PBA-CyD 水溶液と PVA 水溶液を混合し、20°C で 14 時間静置するとハイドロゲルが形成された。水溶性の PVA がハイドロゲルを形成するには PVA 同士の架橋が必要であり、その機構として、PBA-CyD による架橋の他に PVA 同士間における水素結合が関与している可能性があった。しかし、PVA のハイドロゲルを形成させるためには凍結融解のような操作が一般に必要であり、上記の調製条件で PVA 同士間での強い水素結合が生じているとは考えにくい。また、PBA-CyD 水溶液と混合した直後からゲル化が進行したことから、形成されたハイドロゲルが目的物質である PBA-CyD と PVA とのハイドロゲル（PBA-CyD/PVAgel）である可能性は高いと推察した。

第 2 章では、調製したハイドロゲルが、1) PBA-CyD の CyD 部位に PVA を包接した複合体であること、2) PBA 部位と PVA のジオール間におけるエステル結合により架橋されていることを確認した。ハイドロゲルの系内に存在する化合物の組み合わせにおいて、ハイドロゲルの形成に関わる相互作用として、①PVA 同士間における相互作用、②PVA と CyD 部位における相互作用、③PVA と PBA 間における相互作用が考えられる。そこで、これら三つの相互作用の存在を種々の測定方法により調べ、ハイドロゲルの架橋構造を推測した。その結果、①示差走査熱量測定において、PVA 同士間における水素結合に起因する吸熱ピークが観察されなかったことから、PVA 同士間における相互作用は存在しないか極めて小さいこと、②固体サンプルを用いた ^{13}C -NMR スペクトル測定において、 γ -CyD のスペクトルと比較してピークの分裂が解消されたこと、及び PVA 由来のピークが PBA-CyD/PVAgel のスペクトル上では低磁場シフトしていたことから、PVA と CyD 部位間での包接複合体の形成が示唆されたこと、③PBA-CyD/PVAgel（凍結乾燥品）の懸濁液が各種ポリオール化合物（カテコール、フルクトース、グルコース）の添加によってその濁りが減少し、その減少速度が PBA と各ポリオール化合物間の結合定数に依存していたことから、PVA と PBA 部位間の結合の存在が確認されたこと、等を総合的に判断し、想定していた架橋構造が概ね妥当なものであると結論付けた。

第 3 章では、外部刺激に対する応答により、含有する薬物の放出・溶出制御が可能かを調べた。まず、前章で PBA-CyD/PVAgel には、ポリオール化合物存在下においてハイドロゲルが崩壊する刺激応答性が

備わっていることが確認されたことから、モデル薬物としてフルオレセインナトリウム(FI-Na)を用いて、種々ポリオール化合物に対する PBA-CyD/PVAgel からの FI-Na の放出を測定した。フルクトース (100 mM)、もしくはグルコース (100 mM) 水溶液を添加して 37°C 条件下で放出実験を行った結果、フルクトースとグルコースとで放出速度は異なり、フルクトース存在下で著しく速かった。放出初期の段階で水ゲルからの FI-Na の放出は、W.I.Higuchi 式に従い、PBA-CyD/PVAgel 中の拡散により FI-Na の放出が制御されていた。フルクトースの場合、添加後時間が経過すると PBA-CyD/PVAgel は完全に溶解し、FI-Na の放出率はほぼ 100% に達した。これは PBA の PVA に対する結合がフルクトースへ置換されることでゲルの網目構造が大きく変化してゲルが崩壊し、含有した FI-Na がすべて溶出されたためと考えられた。一方、グルコース存在下においては顕著な放出促進は認められず、実験後 PBA-CyD/PVAgel は残存していた。この差は PBA に対する結合能の差に起因しており、結合能が強いフルクトースのようなポリオール化合物については顕著な応答が得られたものと考えられる。結合能が弱いグルコースについては、グルコースオキシダーゼ(GOx)により、グルコースがグルコン酸へ変換されるときに過酸化水素を生成し、PBA はその過酸化水素によってボロン酸部分が解離されると予想された。つまり、グルコース共存下で GOx によって PBA-CyD/PVAgel が崩壊すると考えられた。そこで、次に FI-Na と GOx を混合した PBA-CyD 溶液を用いて PBA-CyD/PVAgel を調製し、種々濃度のグルコース (1, 5, 10 mM)、または 10 mM のフルクトース溶液を添加して放出実験を行った結果、フルクトースでは放出速度に変化はなかったが、グルコースでは、その濃度に依存してゲル中の FI-Na の拡散係数の上昇に伴う放出速度の増大と、その後のゲルの溶解により含有する FI-Na がほぼ全量放出された。このように PBA-CyD/PVAgel は、外部刺激に対して含有薬物の放出制御が可能であることがわかった。

以上、本研究では、PBA-CyD/PVAgel が PVA に対して CyD 部位と PBA 部位各々で異なる相互作用を起こし、PVA 同士を架橋して水ゲルを調製することに成功した。このような架橋構造をもつ水ゲルの報告はこれまでに無く、新しい構造を持つ水ゲルとして提唱できる。加えて、PBA-CyD/PVAgel は外部刺激に応答して含有する薬物の放出・溶解を制御できる新規の機能性基剤としての有用性も高いと考えられる。よって、本論文は、本研究科課程による博士(薬学)論文に十分値するものと判定した。