学位論文要旨

鈴木　莉奈

（MS 明朝、10.5 ポイント、２頁：図表は不可）

近年の薬剤耐性菌の蔓延はきわめて深刻な状態であり、2013 年の耐性菌による死者は世界で約 70 万人であった。現在、耐性菌は猛烈な勢いで多様化、増殖しており、2050 年には世界の年間の死者数が 1000 万人に上ると推定されている。感染症対策の基本として、医療従事者から患者への感染防止が必要不可欠であり、簡便に予防・拡散防止する手段が求められ、近年耐性菌を防ぐために天然由来の機能性香料に注目が集められている。本研究はその中でも、抗菌作用を示すヒノキチオールに着目した。

ヒノキチオール (HT) は、トロポロン骨格を有する天然精油成分である。トロポロン類似の性質を示し、抗細菌作用、抗真菌作用および抗炎症作用など有効性は多岐にわたる。しかしながら、HT は水への溶解性が低いため、HT を利用した製品開発において障害となりうる。HT の溶解性の向上および安定性の改善をはかる手法としてシクロデキストリンを用いた複合体調製があげられる。

シクロデキストリン (CD) は、グルコピラノースが α-1,4 グルコシド結合によって環状に結合した構造をとり、グルコピラノースの数により α-シクロデキストリン (αCD)、β-シクロデキストリン (βCD) および γ-シクロデキストリン (γCD) に分けられる。CD は、環の外側および入口付近が親水性であるのに対し、空洞内は疎水性である特性により疎水性ゲスト分子を空洞内に取り込むことで包接複合体を形成し、ゲスト分子の溶解性向上や安定性向上に伴う、抗菌活性効果の利用が期待できる。

本研究は、天然由来の抗菌成分として HT を用い、HT の利用拡大を目的として混合粉砕法による HT/CDs 包接複合体を形成し、HT の物理化学的性質、溶出性および抗菌活性への影響について検討した。さらに、手指衛生を想定した HT/CD 複合体を利用した新規抗菌ゲル化製剤開発の基礎的研究を行った。

第 1 章：α、β、γ-シクロデキストリンおよび誘導体を用いた複合体の調製および評価

第 1 章は、HT と CDs での包接複合体が形成されるか検証を行った。βCD は多種の誘導体が存在し、それぞれの性質を利用した応用化が進んでいる。そこで、CD 誘導体を用いて HT/CD 包接複合体の調製を行い、それぞれの βCD および γCD 誘導体の性質の違いが HT の溶解性および抗菌作用に与える影響について評価した。

HT/CDs をモル比 2/1、1/1 および 1/2 で秤量し、Vortex Mixer を用いて 1 分間混合したものを物理的混合物 (PM) とした。さらに PM (2/1、1/1 および 1/2) 1g をアルミナセルに充填後、振動型ロッドミルを用いて 60 分間混合粉砕したものを混合粉砕物 (GM) とした。

調製した混合粉砕物の包接複合体形成を評価するために、粉末 X 線回折 (PXRD) 測定、示差走査熱量 (DSC) 測定、赤外 (IR) 吸収測定、^{1}H-^{1}H 2D-NMR 測定を行った。物性評価により、HT と αCD はモル比 1/2、HT と βCD、γCD、HPβCD、MβCD、TAβCD および HPγCD ではモル比 1/1 において包接複合体の形成が確認された。^{1}H-^{1}H 2D-NOESY NMR 測定の結果、各 GM において HT 分子中の七員環部分およびイソプロピル基部分と CD 分子中の内側に存在する H-3,5,6 位が溶液中において分子間相互作用していることが確認された。HT/CDs の混合粉砕は、物質に機械的エネルギーを与えることによるメカノケミカル効果が起因し、粉体間 (HT/CDs) での複合体調製が可能であることが明らかとなった。

第 2 章：HT/CDs 複合体における有用性の評価

抗菌成分を CD で包接することにより、抗菌活性の向上が報告されている。そこで、HT の抗菌性を評価するために、寒天希釈法を用いて最小発育阻止濃度 (MIC) を算出した。試験菌は細菌 4 種 (*B.sub*: *Bacillus subtilis*、*E.coli*: *Escherichia coli*、*S.a*: *Staphylococcus aureus*、*P.aer*: *Pseudomonas aeruginosa*) を用いた。GM (HT/αCD=1/2)、GM (HT/βCD=1/1)、GM (HT/γCD=1/1)、GM (HT/HPβCD=1/1)、GM (HT/MβCD=1/1) および GM (HT/HPγCD=1/1) の MIC は、*B.sub*:20μg/mL、*S.a*:40μg/mL および *E.coli*:20μg/mL を示し、HT 単独の MIC (*B.sub*:80μg/mL、*S.a*:160μg/mL、*E.coli*:80μg/mL) と比較して約 4 倍抗菌性の向上が確認された。*P.aer* において MIC は 160μg/mL を示し、HT 単独の MIC (320μg/mL) と比較して約 2 倍の抗菌性の向上が確認された。また、GM (HT/TAβCD=1/1) の MIC は、*B.sub*:40μg/mL、*S.a*:80μg/mL および *E.coli*:40μg/mL を示し、HT 単独の MIC と比較して約 2 倍抗菌性の向上が確認された。*P.aer* において MIC は 320μg/mL を示し、同等の抗菌力が確認された。HT/CD 包接複合体の詳細な抗菌メカニズムを解明するために、LIVE/DEAD® *BacLight* Bacterial Viability Kits を用いて細胞膜傷害性評価を行った。試験菌は *E.coli* を用いた。細胞膜傷害性評価の結果、HT 単独において HT の用量依存的に死菌数の増加が確認されたことから、HT が細胞膜に対して傷害を与えることで抗菌作用を示していることが推察された。GM において HT 単独と比較し、低濃度で HT の抗菌作用を発揮することが確認された。そこで、CD 単独の効果を確認したところ、CD 単独では菌体膜への傷害が確認されなかった。以上の結果より、HT は CD で包接されることにより、障壁となる菌体膜の透過性が促進され、HT の抗菌活性の向上が得られたと推察した。

第 3 章：HT/CDs 複合体を用いた製剤応用の検討

HT/γCD 包接複合体を用いて増粘剤中に HT を分散させたゲルを調製し、製剤開発を試みた。ゲル化製剤の HT の濃度は抗菌試験で得られた MIC より 320 μg/mL とした。増粘剤として、キサンタンガム (Xan) および κ, λ, ι-カラギーナン (κ, λ, ι-Car) を用いた。増粘剤の濃度を HT/γCD-Xan1.25%, 1.5%, 1.75%、HT/γCD-κ-Car0.5%, 0.75%, 1.0%、HT/γCD-λ-Car1.25%, 1.5%, 1.75%および HT/γCD-ι-Car0.5%, 0.75%, 1.0% に調製したゲル化製剤を用いて実験を行った。比較対象として、臨床現場で用いられている速乾性すり込み式手指消毒剤である、エタプラスゲル (EP) を用いて比較評価を行った。外観・分散性評価、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った結果、ゲル化製剤中に HT が分散していることが明らかとなった。粘性、pH、粘弾性、展延性の評価の結果、HT/γCD-Xan1.5%が EP と同様の挙動を示した。溶出性および安定性の評価の結果、HT/γCD-Xan1.5%が簡便な臨床応用を目指した新規ゲル化製剤として有用である可能性が示された。

総括

本研究において、混合粉砕法を用いた HT/CDs 包接複合体の調製に成功し、CD によって HT との分子間相互作用に違いが生じることが明らかとなった。HT/γCD 包接複合体含有ゲル化製剤の調製には、ゲル化基材として Xan1.5%が簡便で有効的であることが示された。よって、手指消毒薬としての HT/γCD 包接複合体含有ゲル化製剤は、簡便で安全な新規抗菌剤として今後の臨床応用への利用拡大が期待できる。

The spread of drug-resistant bacteria in recent years is a very serious condition, and the death caused by resistant bacteria in 2013 was about 700,000 people in the world. Currently, resistant bacteria are diversifying and growing with furious momentum, and it is estimated that in 2050 the number of deaths of the world will be 10 million annually. Prevention of infection from medical staff to patients is indispensable as a basis for countermeasures against infectious diseases, means for preventing and preventing diffusion is required conveniently, and in recent years attention has focused on naturally derived functional fragrances in order to prevent resistant bacteria Has been done. Among them, this study focused on hinokitiol showing antibacterial action.

Hinokitiol (HT) is a natural essential oil component having a tropolone skeleton. It exhibits properties similar to tropolone and its effectiveness such as antibacterial action, antifungal action and anti-inflammatory effect varies. However, HT shows low water solubility and can be an obstacle in product development using HT. As a method for improving the solubility of HT and improving the stability, complex preparation using cyclodextrin can be mentioned.

Cyclodextrin (CD) takes a structure in which glucopyranose is bonded to the annular by alpha-l, 4-glucosidic bonds, the number of glucopyranose α-cyclodextrin (αCD), β-cyclodextrin (βCD) and γ-cyclodextrin (γCD). In CD, the inclusion complex is formed by incorporating a hydrophobic guest molecule into the cavity due to the property that inside and outside of the ring are hydrophilic, the inside of the cavity is hydrophobic, and dissolution of the guest molecule It can be expected to use the antibacterial activity effect accompanying improvement of stability and stability improvement.

In this study, HT was used as a naturally derived antimicrobial component, HT/CDs inclusion complex was formed by co-grinding method for the purpose of expanding the use of HT, and the HT/CD physicochemical properties, dissolution and antibacterial activity the influence was investigated. In addition, basic research on the development of novel antimicrobial gelling formulation using HT/CD complex assuming hand hygiene was conducted.

Chapter 1: Preparation and evaluation of complexes using α, β, γ-cyclodextrin and derivatives

The first chapter examined whether inclusion complexes were formed between HT and CDs. Currently βCD has various kinds of derivatives, and their applications are advancing utilizing their properties. Therefore, HT/CD inclusion complexes were prepared using CD derivatives, and the influence of the difference in properties of βCD and γCD derivative on HT solubility and antibacterial action was evaluated.

HT/CDs were weighed at molar ratios of 2/1, 1/1 and 1/2 and mixed for 1 minute using a Vortex Mixer as the physical mixture (PM). Further, 1 g of PM (2/1, 1/1 and 1/2) was packed in an alumina cell and mixed and pulverized for 60 minutes using a vibration type rod mill to obtain a ground mixture (GM).

Powder X-ray diffraction (PXRD) measurement, differential scanning calorimetry (DSC) measurement, infrared (IR) absorption measurement, ^{1}H-^{1}H 2D-NMR measurement was carried out. Physical property evaluation confirmed the formation of inclusion complex at HT/αCD molar ratio 1/2, HT/βCD, γCD, HPβCD, MβCD, TAβCD and HPγCD at a molar ratio of 1/1. As a result of ^{1}H-^{1}H 2D-NOESY NMR measurement, it was found that in each GM, seven seven-membered ring skeleton part and isopropyl group part in the HT molecule and H-3, 5 and 6. Co-grinding of HT/CDs resulted in a mechanochemical effect by giving mechanical energy to the material, making it possible to prepare a composite between powders (HT/CDs).

Chapter 2: Evaluation of usefulness in HT/CDs complex

Improvement of antibacterial activity has been reported by inclusion of antibacterial ingredients in CD. Therefore, in order to evaluate the antimicrobial property of HT, the minimum inhibitory concentration (MIC) was calculated using the agar dilution method. Four bacteria were used (*B.sub*: *Bacillus subtilis*, *E. coli*: *Escherichia coli*, *S. a*: *Staphylococcus aureus*, *P. aer*: *Pseudomonas aeruginosa*). GM (HT/αCD=1/2), GM (HT/β=1/1), GM (HT/γCD= 1/1), GM (HT/HPβCD=1/1), GM (HT/MβCD=1/1) and GM (HT/HPγCD=1/1) showed *B.sub*: 20 μg/mL, *S.a*: 40 μg/mL and *E. coli*: 20 μg/mL. Improvement in antimicrobial property was confirmed about 4 times compared to MIC (*B.sub*: 80 μg/mL, *S.a*: 160 μg/mL, *E. coli*: 80 μg/mL) alone with HT. In *P. aer*, the MIC was 160 μg/mL, which was about twice as high as the MIC (320 μg/mL) alone for HT alone. In addition, the MIC of GM (HT/TA βCD=1/1) shows 40 μg/mL of *B.sub*, 80 μg/mL of *S.a* and 40 μg/mL of *E.coli*, which is about 2 improvement of double antimicrobial property was confirmed. In *P. aer*, MIC showed 320 μg/mL, and the antibacterial activity equivalent to HT alone was confirmed. To elucidate the detailed antimicrobial mechanism of the HT/CD inclusion complex obtained by previous studies, a bacterial cell viability assay was performed. In order to elucidate the detailed antimicrobial mechanism of HT/CD inclusion complex, cell membrane toxicity evaluation was carried out using LIVE/DEAD® *BacLight* Bacterial Viability Kits. *E. coli* was used as the test bacteria. As a result of evaluating cell membrane damage, HT alone showed an increase in killed bacteria in a dose-dependent manner in HT alone, so it was inferred that HT shows an antibacterial effect by injuring the cell membrane .It was confirmed that GM exhibited antibacterial action of HT at low concentration compared with HT alone. Therefore, when the effect of CD alone was confirmed, no injury to the bacterial membrane was confirmed by CD alone. From the above results, it was inferred that inclusion of HT in CD accelerated the permeability of the bacterial cell membrane as a barrier, and improved HT antimicrobial activity.

Chapter 3: Study on formulation application using HT/CDs complex

HT/γCD inclusion complex was used to prepare a gel in which HT was dispersed, and tried to develop a formulation.The concentration of HT in the gelled preparation was 320 μg/mL from the MIC obtained in the antibacterial test. Xanthan gum (Xan) and κ, λ, ι-carrageenan (κ, λ, ι-Car) were used as thickeners. 1.5%, 1.75%, HT/γCD-κ-Car 0.5%, 0.75%, 1.0%, HT/γCD-λ-Car 1.25%, 1.5 %, 1.75% and HT/γCD-ι-Car 0.5%, 0.75%, 1.0%. Comparative evaluation was carried out using Etaplasgel (EP), a quick-drying rubbing-type hand disinfectant used in clinical practice. Evaluation of appearance/dispersibility and observation using a fluorescence microscope revealed that HT was dispersed in the gelled preparation. As a result of evaluation of viscosity, pH, viscoelasticity and spreadability, HT/γCD-Xan 1.5% showed behavior similar to that of EP. As a result of the evaluation of dissolution property and stability, it was shown that 1.5% HT/γCD-Xan is useful as a novel gelled preparation aiming at convenient clinical application.

Conclusions

In this study, preparation of HT/CDs inclusion complex using mixed grinding method was successful and it became clear that the difference in intermolecular interaction with HT was caused by CD. It was revealed that Xan1.5% as a gelled base material was simple and effective for preparing a gelled preparation containing HT/γCD inclusion complex. Therefore, the gelled preparation containing HT/γCD inclusion complex as hand sanitizer can be expected to be expanded for future clinical application as a new and convenient safe antibacterial agent.

論文審査の結果の要旨

天然物由来の精油成分には、抗細菌作用、抗真菌作用、抗ウイルス作用、抗酸化作用などを有するものが多く存在することが知られている。精油成分は一般に親油性が高く、これらの作用を期待できたとしても、医療や健康分野でそれらの特性を利用した製品を開発するためには製剤学的な工夫が必要である。本論文は、ヒノキから得られる精油成分であるトロポロン誘導体のヒノキチオール（HT）に着目し、混合粉砕法を用いて種々シクロデキストリン類（CDs）への包接複合体化を検討し、手指消毒に利用可能な外用ゲル製剤への応用を試みている。本論文は3章からなり、第1章では内腔サイズの異なるCDsおよび誘導体化CDsにおけるHT包接複合体（HT/CDs）の化学的特徴付け、第2章ではHT/CDsの抗菌（抗細菌および抗真菌）活性と皮膚に対する刺激性評価、第3章ではγCDとHTとの複合体（HT/γCD）を用いてゲル製剤を調製し、製剤の物性測定、製剤からのHT放出特性評価、ゲル製剤中での薬物安定性評価に基づいてその有用性について考察している。

第1章第1節では、内腔サイズの異なるαCD、βCD、およびγCDを用いて混合粉砕法によるHTとの複合体形成について検討している。粉末X線回折、示差走査熱量測定、熱重量測定、および赤外分光光度測定の結果、固体状態において、いずれのCDsとも包接複合体を形成することを明らかにした。複合体形成による吸光度変化を利用したJob's plotおよび複合体の^{1}H-NMR測定の結果、包接複合体のモル比（HT : CD）は、αCDで1 : 2、βCDとγCDでは1 : 1であることを明らかにした。2次元NMR測定により溶液状態での複合体の分子状態の評価では、αCDではHTの七員環の一部とイソプロピル基がαCDの広い縁部に包接され、βCDでは七員環部分が狭い縁部、イソプロピル基が広い縁部にそれぞれ相互作用し、γCDではHTの七員環とイソプロピル基の両者が空洞内に位置していることを推測している。

第2節では、さまざまな特性を有するCD誘導体として2-hydroxypropyl-β-CD、methyl-β-CD、triacetyl-β-CD、および2-hydroxypropyl-γ-CD（HPγCD）を選択し、混合粉砕法によるHTとの包接複合体形成について検討している。第1節と同様の手法を用いて特徴付けを行ったところ、いずれのCD誘導体でもHT包接複合体が形成され、そのモル比はいずれも1 : 1であることが示された。2次元NMR測定の解析結果から、CD誘導体によってHTに対する包接様式が異なっていることが示され、これにはCD置換基の立体障害の違いが関与していることを推察している。第1節および第2節で得た包接複合体からのHT溶出性を評価したところ、CDsの種類により溶出特性が異なるという結果が得られ、HT溶出性制御にCDsが利用できる可能性が示唆されている。

第3節では、HTの構造的骨格を成しているトロポロン（TPN）とγCDとの包接複合体（TPN/γCD）形成について検討し、他のトロポロン誘導体への応用拡大への可能性について考察している。異なる調製法、すなわち混合粉砕法および共沈法を用いたところ、共沈法で

はモル比（TPN：γCD）が2：1の包接複合体が得られるのに対し、混合粉砕法では2：1と4：1 の比率の異なる包接複合体が得られ、調製法により包接複合体の分子状態が異なるという知見を得ている。また、先に示したHT/γCDでは1：1であったことから、同じトロポロン骨格を有していても、ゲスト分子全体としての物理化学的性質の違いが包接様式に大きく影響することを示している。

第2章では、まず枯草菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌、および緑膿菌を用い、HT/CDsの抗細菌活性を評価している。第1章で調製した7種のHT/CDsのこれら細菌に対する最小発育阻止濃度（MIC）はHT単独に比べて1/2～1/4に低下すること、またTime-kill assayの結果からHT/CDsはHT単独に比べて短時間で殺菌作用を示すことを明らかにしている。大腸菌を用い、電位感受性プローブおよび細胞膜透過性染色試薬を利用してフローサイトメトリーにより膜傷害性の観点からHT/CDsの作用を検討したところ、CDsの種類によっては作用の遅延を引き起こす場合や殺菌とは異なる作用を示すものがあるものの、HT/γCDでは膜傷害作用により低濃度においても速やかな抗細菌作用を示すことを明らかにしている。なお、CDs単独では膜傷害を与えないことも確認している。一方、酵母菌および糸状菌などの真菌に対しては、いずれのHT/CDsもHT単独にくらべてMICを低下させる傾向にあったが、細菌に対するよりは作用が弱いという結果を得ている。また、手指消毒に用いることを想定し、HT/γCDを用いて皮膚刺激性を評価したところ、明らかな刺激性を示さないという結果を得ている。

第3章では、HT/CDsの手指消毒剤への応用を踏まえ、ゲル化剤としてキサンタンガム（Xan）とκ、λ、ιの3種のカラギーナン（κ-Car、λ-Car、ι-Car）、HT/CDsとしてHT/γCDを用いてゲル製剤を調製し、その特徴付けを試みている。ゲルの粘性測定結果を基に1.5% Xan、1.0% κ-Car、1.75% λ-Car、1.0% ι-Carを選択し、レオグラムによる構造粘性的な特徴、ゲルのpH、ゲル製剤からのHT放出性、スプレッドメーターによる展延性、フリクシオメーターを用いた機械的使用感、およびゲル製剤中でのHT安定性の観点から、HT/γCDを1.5% Xanでゲル化した製剤がHT含有手指消毒剤としての有用性が高いことを示している。

以上、本論文の結果から、混合粉砕法を用いて精油成分であるHTをCDsに包接することが可能であり、CDsの種類を変更することによりゲスト分子の溶出性制御が可能であることが示された。またHTの抗菌活性は、包接複合体化することにより特に細菌に対して作用が増強されることを示しており、HTのような抗菌活性を有する精油成分を用いた手指消毒剤の開発に対して新たな知見を与えるものであると評価できる。調製したHT/CDsおよびゲル製剤に対して十分な物理化学的特徴づけもなされており、学術的にも意義深い内容であると判断できる。よって本論文は、本研究科課程による博士（薬学）の論文に十分に値するものと判断する。