

ヒノキチオール固体分散体の調製および 外用抗菌製剤へのアプローチ

鈴木 莉奈

目次

略語一覧	5
緒言	7
第1章 HT/CDs 複合体の調製および物性評価	11
序	11
第1節 混合粉碎法による HT と α CD、 β CD および γ CD 複合体形成の検討	12
1-1 HT/CDs の複合体比の検討	12
1-2 HT/CDs 複合体における結晶状態の評価	14
1-3 HT/CDs 複合体の熱的性質の検討	19
1-4 HT と CDs との包接モル比の検討	25
1-5 固体状態における分子状態の検討	30
1-6 HT/CDs 複合体の溶出性評価	38
1-7 溶液状態における分子間相互作用の検討	43
小括	53
第2節 混合粉碎法による HT と CD 誘導体における複合体形成の検討	54
序	54
2-1 HT/CD 誘導体の複合体比の検討	55
2-2 HT/CD 誘導体複合体の熱的性質の検討	58
2-3 HT/CD 誘導体複合体における結晶状態の評価	60
2-4 固体状態における分子状態の検討	65
2-5 HT/CD 誘導体複合体の溶出性評価	71
2-6 溶液状態における分子間相互作用の検討	75
小括	81

第3節 混合粉碎法と共沈法による TPNと γ CD 複合体形成の検討	82
3-1 TPN/ γ CD 複合体の熱的性質の検討	84
3-2 TPN/ γ CD 複合体における結晶状態の評価	86
3-3 TPNと γ CDとの包接モル比の検討	91
3-4 固体状態における分子状態の検討	93
3-5 溶液状態における分子間相互作用の検討	95
小括	101
第1章 総括	102
第2章 HT/CDs 複合体における有用性の評価	103
第1節 HT/CDs 複合体における抗菌活性の評価	104
1-1 HT における抗菌活性の検討	104
1-2 HT/CDs 複合体における細菌に対する最小発育阻止濃度(MIC)の算出	105
1-3 HT の時間依存的抗菌活性の評価	108
1-4 HT/CDs 複合体の時間依存的抗菌活性の評価	110
1-5 HT および CDs における細菌膜電位変化の評価	115
1-6 HT/CDs 複合体における細胞膜傷害性の評価	118
小括	123
第2節 HT/CDs 複合体における抗真菌活性の評価	124
2-1 HT の真菌に対する効果の評価	125
2-2 HT/CDs 複合体の真菌に対する効果の評価	126
小括	129

第3節 HT/ γ CD 複合体における皮膚刺激性の評価	130
小括	132
第2章 総括	133
第3章 HT/CDs 複合体を用いた製剤応用の検討	134
序	134
第1節 HT/ γ CD 複合体を用いたゲル化製剤の調製	136
1-1 調製したゲル化製剤の妥当性の評価	136
第2節 HT/ γ CD 複合体ゲル化製剤の物理化学的性質の評価	138
2-1 粘度測定	138
2-2 粘弾性測定	140
2-3 pH 測定	142
2-4 展延性測定および降伏値の算出	144
2-5 放出試験	146
第3節 HT/ γ CD 複合体ゲル化製剤の安定性の評価	148
第4節 HT/ γ CD 複合体ゲル化製剤の使用感の評価	150
小括	152
総括	153
第4章 結論	156

謝辞	158
実験の部	159
参考文献	178

略語一覧

本論文中で使用した略語について以下に記載する。

CCCP	Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CD	Cyclodextrin シクロデキストリン
CFU	Colony forming unit コロニー形成因子
CLSI	Clinical and laboratory standards institute
COSY	Correlation spectroscopy 同種核相関分光法
CP	Co-precipitate
DiBAC ₄ (3)	Bis (1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol, sodium salt
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DSC	Differential scanning calorimetry
FCM	Flow cytometry
FDA	Food and drug administration アメリカ食品医薬品局
GM	Ground mixture 混合粉碎物
HT	Hinokitiol ヒノキチオール
IR	Infrared spectroscopy 赤外分光法
JCM	Japan collection of microorganisms
MHA	Mueller-hinton II agar
MIC	Minimum inhibitory concentration
MOPS	Morpholinepropanesulfonic acid
MRSA	Methicillin-resistant staphylococcus aureus
NBRC	NITE biological resource center
NMR	Nuclear magnetic resonance 核磁気共鳴

NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
OD _{600nm}	Optical density at 600 nm
PBS	Phosphate buffered saline
PM	Physical mixture 物理的混合物
R.H.	Relative humidity 相对湿度
ROESY	Rotating frame nuclear overhauser enhancement spectroscopy 回轉座標系 NOE
SEM	Scanningelectron microscopy 走査型電子顯微鏡
TSA	Trypicase soy agar
WHO	World health organization 世界保健機關

種である。トロポロンは、分子内および分子間水素結合をとり、それらに起因した興味深い性質を示すことが報告されている。例えば、抗菌作用⁷⁾、抗炎症作用⁸⁾、抗酸化作用⁹⁾および抗腫瘍作用¹⁰⁾などの薬理学的作用および生化学的作用を有することが知られている。そのため、トロポロン誘導体であるコルヒチンやヒノキチオールは、医薬品や医薬部外品として様々な分野で応用研究がなされている^{11, 12)}。また、トロポロン骨格は多種の化合物への誘導が可能であり、今後医薬品分野での新たなファーマコフォアとして幅広い構造展開が可能である。

ヒノキチオール (2-hydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cyclohepta-2,4,6-triene-1-one, HT) は、タイワンヒノキの揮発性成分中から発見された酸性物質である。トロポロン骨格を有する天然精油成分であり、モノテルペンの芳香族化合物である。HT は、トロポロン類似の性質を示し、抗菌活性 (抗細菌作用¹³⁾、抗真菌作用^{14, 15)}) および抗ウイルス作用¹⁶⁾を有する。また、抗酸化作用¹⁷⁾、メラニン抑制作用¹⁸⁾などを利用した酸化防止剤および日焼け防止剤などの化粧品としての利用が期待される。その他に、HT は、抗炎症作用¹⁹⁾および抗腫瘍作用²⁰⁾などの薬理学的作用および生化学的作用を有することが知られている。このように HT は、食品や化粧品などの幅広い分野で用いられており、今後さらなる利用が期待できる。しかしながら、香料である HT は昇華性があり、精油成分であるため水への溶解性が乏しいことから、抗菌活性や抗酸化作用などの HT の有効性を十分に使用できないことが考えられる。

シクロデキストリン (CD) は、D-グルコピラノースが α -1,4 結合によって環状に結合した構造である²¹⁾。グルコピラノースの構成数により、グルコース 6 個からなる α -シクロデキストリン (α CD)、7 個からなる β -シクロデキストリン (β CD) および 8 個からなる γ -シクロデキストリン (γ CD) がよく知られており、それぞれが包接化合物形成におけるホスト分子として幅広く用いられている。CD は環の入口付近と外側は親水性であるのに対し、空洞内は疎水性を示す。この性質を利用して、疎水的相互作用などにより種々の

疎水性ゲスト分子を空洞内に取り込み包接複合体を形成することが知られている²²⁾。包接複合体の調製法には、混合粉砕法²³⁾、共沈法²⁴⁾、凍結乾燥法²⁵⁾、噴霧乾燥法²⁶⁾および密封加熱法²⁷⁾等が知られている。なかでも混合粉砕法は、固体状態での調製が可能であり、簡便に調製可能な手法である。混合粉砕法は、メカノケミカル効果を利用した調製法であり、有機溶媒を用いないため、残留溶媒がないことがメリットとしてあげられる。CDによって包接されたゲスト分子は、物理化学的性質が変化することで溶解性改善、安定性向上、抗菌性向上およびバイオアベイラビリティの向上などが期待され、医薬品分野、食品分野および工業分野など、様々な分野に幅広く利用されている²⁸⁾。また、CDの空洞はその種類によってサイズが異なり、それぞれのCDのサイズに合う大きさと形のゲスト分子を包接し、包接化合物の形成は立体選択的である。そのため、同じゲスト分子を用いた場合でもCDの種類によって包接様式が異なることが知られている²⁹⁾。例えば、フラボノイドであるフィセチンをゲスト分子として用いた場合、CDの種類によってCD空洞のサイズが異なるため、形成された複合体の安定性に影響するとの報告がある³⁰⁾。また、包接様式が異なることで薬物の放出性に影響を与える可能性がある。

また、近年では天然のCDの多くの化学的に修飾された誘導体が市販されている³¹⁻³³⁾。これらは、CDの外表面上のいくつかのヒドロキシル基を、メチル基、ヒドロキシプロピル基、スルホブチルエーテル基などの他の官能基で置換することによって得られ、CD誘導体も様々な分野において注目されている。例えば、アルキル化誘導体である2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン(HP β CD)は、錯体化能力、高い水溶性および低毒性であることから、医薬品の添加剤としても用いられるなど関心が高まっている³⁴⁾。抗生物質であるリファブチンと β CDを用いて包接複合体を形成することにより黄色ブドウ球菌および大腸菌の2種の細菌に対するリファブチンの抗菌活性が向上したとの報告がある³⁵⁾。 β CD

の疎水性の空洞内にリファブチンの疎水性部分が包接され、グラム陽性菌およびグラム陰性菌の細胞膜との相互作用により、細胞膜を破壊し、最終的に細菌細胞の溶解に寄与することで、高い抗菌作用が確認されている。また、精油成分であるカルバクロールを β CD で包接することで、カルバクロールの抗菌活性が向上したとの報告がある³⁶⁾。このメカニズムとして、 β CD で包接することで細菌の細胞膜内へカルバクロールの到達を増強させたことが寄与していると結論付けている。このように、CD を用いて HT の溶解性の改善、それに伴い抗菌物質としての応用が可能となれば、アルコールフリーの手指衛生が可能となり、医療における利用拡大が期待できる。さらに、混合粉碎によるメカノケミカル効果によって包接複合体が調製可能となれば、溶媒を用いない工業化応用への礎となることが期待される。

そこで本研究は、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碎法による 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 HT/CDs 複合体の調製および物性評価

第 1 章 序

香料などの揮発性成分は、CD と包接複合体を形成することにより、溶解性改善、揮発性抑制および安定化向上などの物理化学的性質の変化を得られることが知られている³⁷⁾。また、ゲスト分子の性質に応じた調製法を選択することは、安定な複合体を得る上で重要となる。よって本研究では、様々な調製法のなかでも固体状態で調製が可能な振動型ロッドミルを用いた混合粉砕法を選択した。混合粉砕法は、有機溶媒を用いないため、残留溶媒が生じない手法である。

また、得られるゲスト分子の物理化学的性質の変化は、形成する複合体形式に依存するため、用いる CD の選択が重要となる。これまでに、多くの研究者により CD および CD 誘導体について様々な検討がされてきた^{38,39)}。それぞれの CD は、空洞サイズ、水溶性など個性的な特性を有することが知られている。

本研究では、第 1 章として、代表的な CD として α CD、 β CD および γ CD を選択し、HT との複合体形成の検討を行った。さらに、CD 誘導体として HP β CD、M β CD、TA β CD および HP γ CD を選択し、それぞれの HT との複合体形成特性について評価した。はじめに、妥当な HT と CD のモル比を推定するために、job's plot 法を用いて複合体組成比の検討を行った。物理化学的性質の評価として、粉末 X 線回折 (PXRD) 測定、示差走査熱量 (DSC) 測定、熱重量 (TG) 測定、赤外 (IR) 吸収測定、固体蛍光測定および ^1H - ^1H 2D-NMR 測定を行った。また、複合体形成による HT の溶出特性を評価するために溶出試験を実施した。

第 1 節 混合粉砕法による HT/CD 複合体形成の検討

1-1 HT/CDs の複合体組成比の検討

一般的に、ゲスト分子と CD との複合体組成比を求める方法として job's plot 法⁴⁰⁾、溶解度相図⁴¹⁾および Benesi-Hildebrand 法⁴²⁾などが用いられている。job's plot 法 (連続変化法) は、複合体形成時にみられる物性変化による吸光度変化の加性性を利用して、複合体組成比を求める方法である。そこで、job's plot 法を用いて HT/CDs の取りうる複合体組成比の検討を行った。CDs 添加に伴う HT の吸光度変化により得られたプロットを Fig.1 に示す。

CD 添加に伴う吸光度変化 (ΔA) において、ゲスト/ホストの比が 0.3 で極大値を示す場合、複合体の組成比は 1/2 であることが報告されている⁴³⁾。ゲスト/ホストの比が 0.5 で極大値を示す場合、複合体の組成比は 1/1 であることが報告されている⁴⁴⁾。 α CD の添加により、HT の吸光度変化は HT/ α CD の比が 0.3 において最大値を示すことから、溶液中における HT/ α CD 複合体の組成比は 1/2 であると推定された。また、 β CD の添加により、吸光度変化は HT/ β CD の比が 0.5 において最大値を示すことから、溶液中における HT/ β CD 複合体の組成比は 1/1 であると推定された。 γ CD の添加により、吸光度変化は HT/ γ CD のモル比が 0.5 において最大値を示したことから、溶液中における HT/ γ CD 複合体の組成比は 1/1 であることが推定された。

よって、本研究は、job's plot 法の結果より HT/CDs のモル比 2/1、1/1 および 1/2 に焦点を絞り、混合粉砕法を用いて調製し、物理化学的性質の評価を行うこととした。

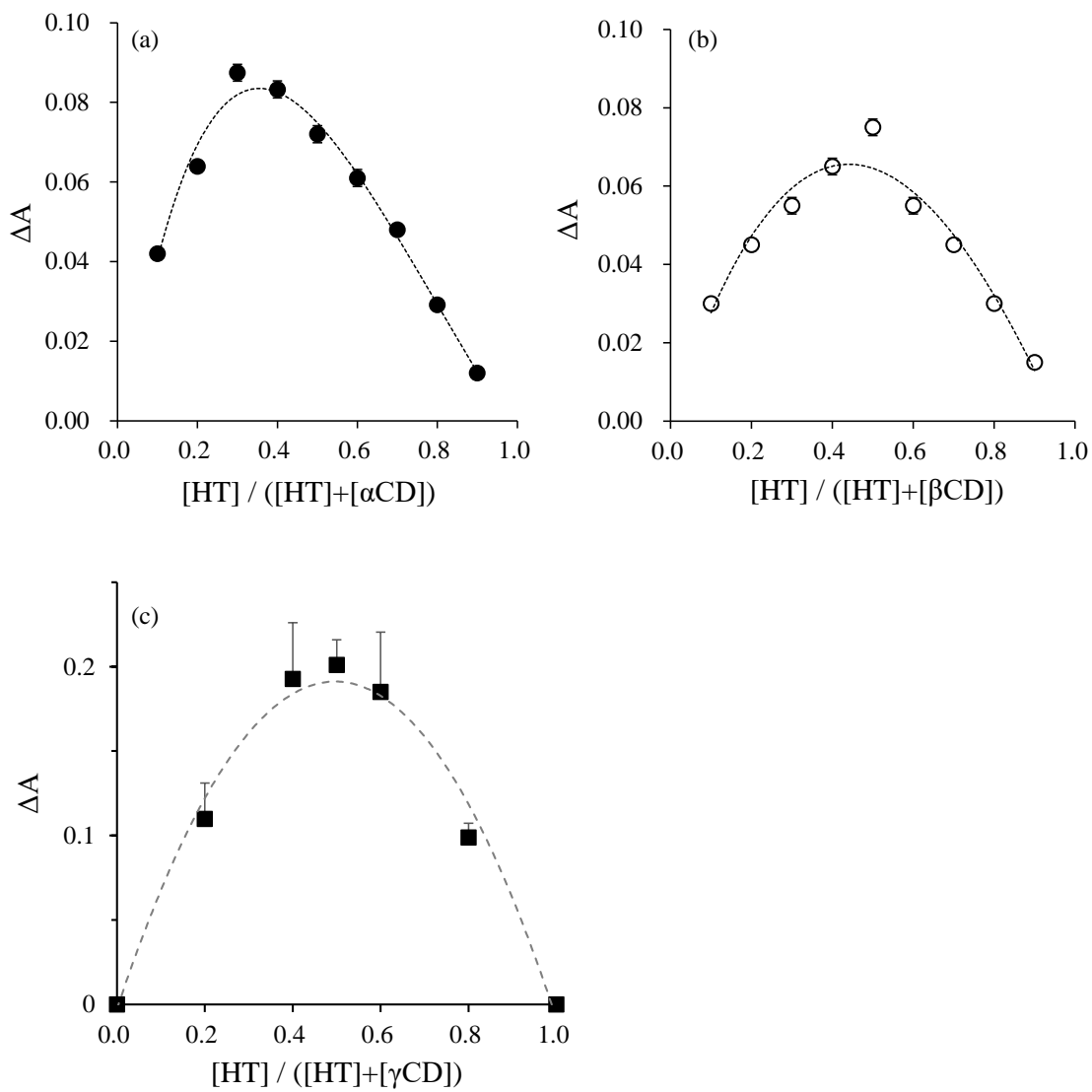


Fig. 1 Job's plot of the HT/CDs systems.
 (a) HT/ α CD, (b) HT/ β CD, (c) HT/ γ CD.
 Results were expressed as mean \pm S.D. (n=3)

1-2 HT/CDs 複合体における結晶状態の評価

物質を粉砕すると、粒子径、比表面積の変化および結晶構造のミクロスケールでの変化が起こる。粉砕による物質の物理化学的変化のひとつとして、メカノケミカル反応が起こることが知られている⁴⁵⁾。メカノケミカル反応とは、粉砕による機械的エネルギー(衝撃・摩擦・圧縮など)を物質に作用させることで、物質の活性化に伴い、他の物質との反応性が向上などの現象が得られることである。これまでにシクロデキストリンを用いて混合粉砕法により、包接複合体が形成されると非晶質化することが報告されている⁴⁶⁾。そこで、混合粉砕法における、HT/CDs 複合体の結晶状態を検討するために、粉末 X 線回折 (PXRD) 測定を行った (Fig.2-4)。

HT 単独および HT 単独粉砕物では、HT の特徴的なピークが $2\theta=10.3^\circ$ および 23.7° に観察された (Fig.2 a, b)。 α CD は、 $2\theta=14.3^\circ$ および 21.7° 付近に特徴的な回折ピークが観察された (Fig.2 c)。 β CD は、 $2\theta=12.5^\circ$ および 18.7° 付近に特徴的な回折ピークが観察された (Fig.3 c)。 γ CD は、 $2\theta=12.2^\circ$ および 16.2° 付近に特徴的な回折ピークが観察された (Fig.4 c)。一方、 α CD、 β CD および γ CD 単独粉砕物では、特徴的な回折ピークは確認されず、ハローパターンを示した (Fig.2-4 d)。PM (HT/ α CD=1/1 および 1/2)、PM (HT/ β CD=2/1 および 1/1) および PM (HT/ γ CD=2/1 および 1/1) では、 $2\theta=10.1^\circ$ 、 23.6° 付近に HT 結晶由来の回折ピークが、 $2\theta=14.3^\circ$ 、 21.7° 付近に α CD 由来の回折ピーク、 $2\theta=12.5^\circ$ 、 18.7° 付近に β CD 由来の回折ピークおよび $2\theta=12.5^\circ$ 、 16.2° 付近に γ CD 由来の回折ピークがそれぞれ観察された (Fig.2-4 e, f)。よって、HT および CD は、それぞれ単独の状態で存在していることが推察された。GM (HT/ α CD=1/1)、GM (HT/ β CD=2/1) および GM (HT/ γ CD=2/1) では、 $2\theta=10.1^\circ$ および 23.6° 付近に HT 結晶由来の回折ピークが観察され、過剰な HT 由来の回折ピークが確認されたと推察した (Fig.2-4 g)。一方、GM (HT/ α CD=1/2)、GM (HT/ β CD=1/1) および GM (HT/ γ CD=1/1) は、HT 単独由来の回折ピークおよび γ CD 由来の回折ピーク

ークは観察されず、ハローパターンを示した⁴⁷⁾ (Fig.2-4 h)。

非晶質化した試料を調湿保存することにより、結晶化が起こることが知られている^{48, 49)}。そこで、混合粉碎によりハローパターンを示した GM (HT/ α CD=1/2)、GM (HT/ β CD=1/1) および GM (HT/ γ CD=1/1) を調湿保存後、PXRD 測定を行った。Hunt らの報告によると、ケージ型にて包接複合体を形成している場合、特徴的な回折ピークは、 $2\theta=12.0^\circ$ 、 14.4° および 21.7° 付近に観察されることが知られている⁵⁰⁾。GM (HT/ α CD=1/2) 調湿物の回折パターン中には α CD のケージ型構造に類似する回折ピーク ($2\theta=11.9^\circ$ 、 14.1° および 21.5°) が認められたことから、ケージ型の構造にて HT と α CD の複合体形成しているものと推察された。また、Karoyo らの報告によると、チャンネル型をとる包接複合体の特徴的な回折ピークは、 $2\theta=7.0$ 、 9.8 、 12.0 、 14.6 、 17.8 および 18.9° 付近に観察されることが知られている⁵¹⁾。GM (HT/ β CD=1/1) 調湿物の回折パターン中には、 β CD のチャンネル型構造に類似する回折ピーク ($2\theta=7.1^\circ$ 、 10.0° 、 12.0° 、 14.5° 、 17.6° および 18.8° 付近) が認められたことから、チャンネル型の構造にて HT と β CD の複合体形成しているものと推察された。 γ CD 由来のヘキサゴナルカラム型構造の特徴的な回折ピークは、 $2\theta=6.0^\circ$ および 15.9° 付近に現れることが知られている⁵²⁾。GM (HT/ γ CD=1/1) 調湿物の新規ピークは、既に報告されている γ CD 由来のヘキサゴナルカラム型構造の特徴的な回折ピークと一致することから、ヘキサゴナルカラム型の構造にて HT と γ CD の複合体形成しているものと推察された。

以上のことから、混合粉碎法によるメカノケミカル効果によって、包接複合体の調製が可能と考えられた。

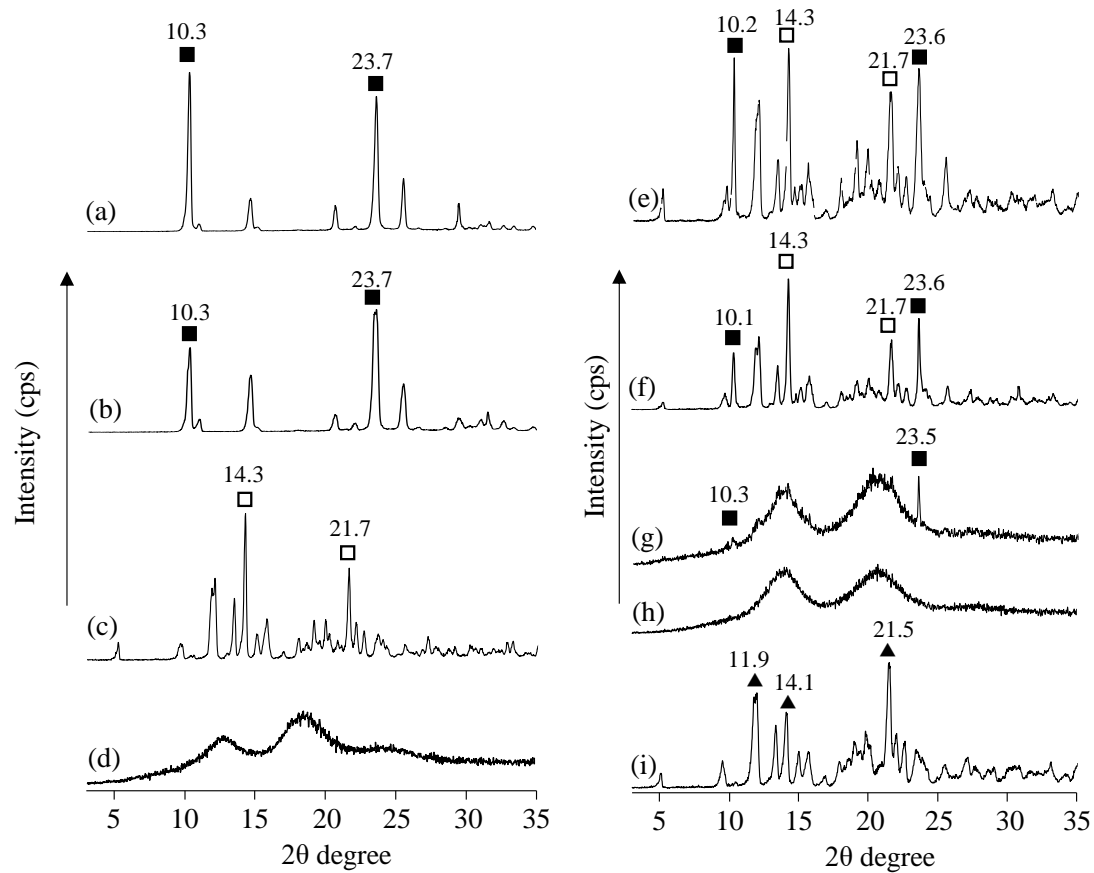


Fig. 2 PXRD patterns of HT/ α CD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) α CD, (d) α CD ground, (e) PM (HT/ α CD=1/1), (f) PM (HT/ α CD=1/2), (g) GM (HT/ α CD=1/1), (h) GM (HT/ α CD=1/2), (i) GM (HT/ α CD=1/2) humidified.

■:HT, □: α CD, ▲: cage type

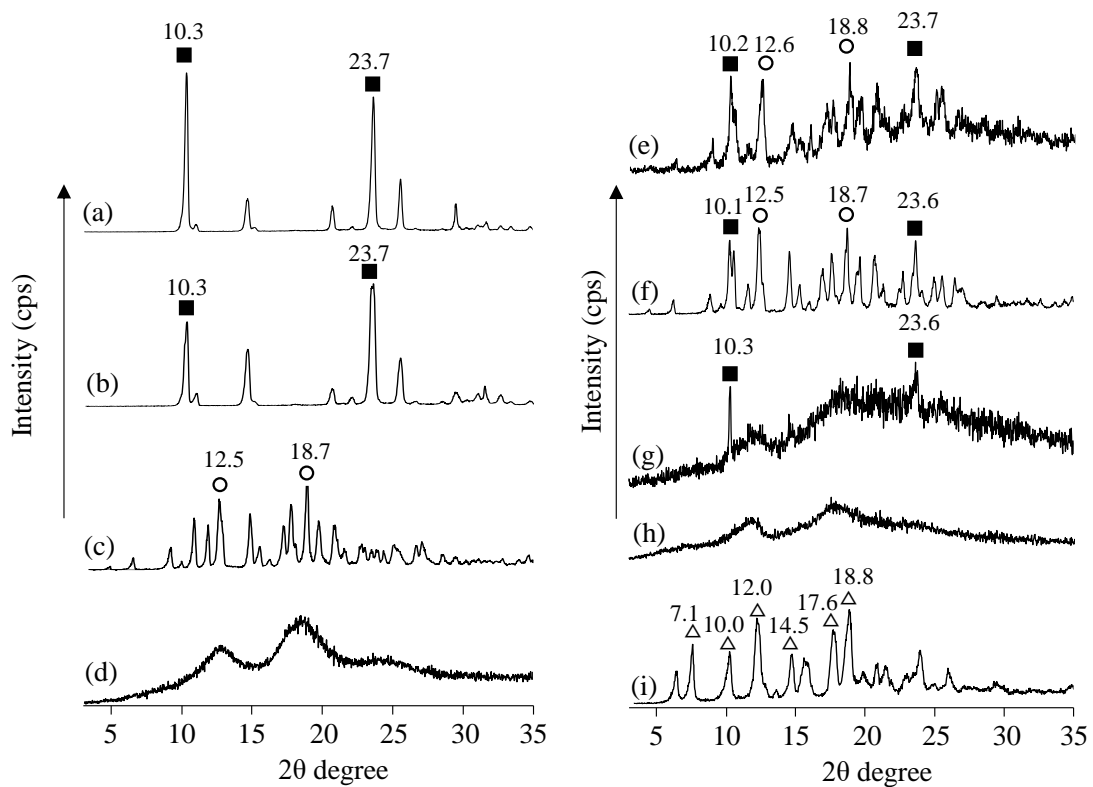


Fig. 3 PXRD patterns of HT/ β CD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) β CD, (d) β CD ground, (e) PM (HT/ β CD=2/1), (f) PM (HT/ β CD=1/1), (g) GM (HT/ β CD=2/1), (h) GM (HT/ β CD=1/1), (i) GM (HT/ β CD=1/1) humidified.

■:HT, ○: β CD, △: channel type

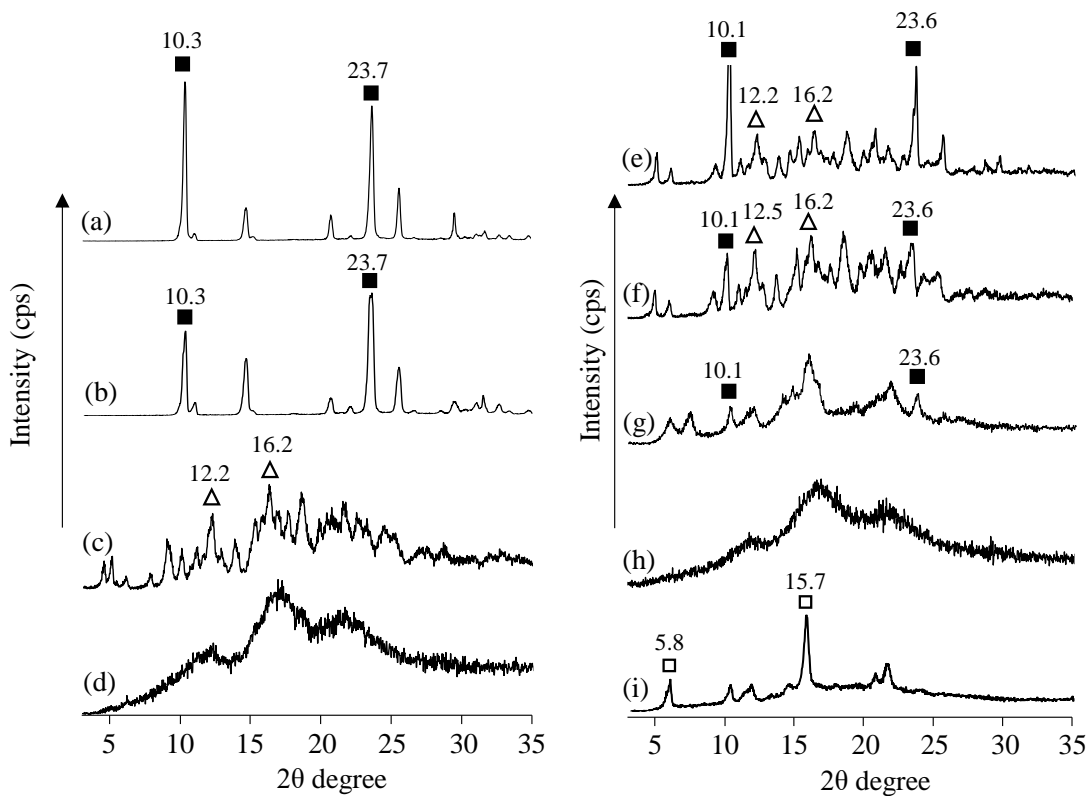


Fig. 4 PXRD patterns of HT/ γ CD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) γ CD, (d) γ CD ground, (e) PM (HT/ γ CD=2/1), (f) PM (HT/ γ CD=1/1), (g) GM (HT/ γ CD=2/1), (h) GM (HT/ γ CD=1/1), (i) GM (HT/ γ CD=1/1) humidified.

■:HT, Δ : γ CD, □: γ CD hexagonal-columnar form

1-3 HT/ γ CD 複合体の熱的性質の検討

一般的に、CD 空洞内にゲスト分子が入り込むと、ゲスト分子の融点、沸点および昇華点が異なる温度へシフトするといった熱的挙動の変化が観察されることが報告されている^{53, 54)}。そこで、混合粉碎物の熱的挙動を検討するために DSC 測定を行った (Fig.5-7)。

HT 単独および HT 単独粉碎物は、HT の融解由来の吸熱ピークが 53°C 付近に確認された (Fig.5 a, b)。PM (HT/ α CD=1/1)、PM (HT/ α CD=1/2)、PM (HT/ β CD=1/1) 、PM (HT/ γ CD=1/1) 、GM (HT/ α CD=1/1)、GM (HT/ β CD=2/1) 、GM (HT/ γ CD=2/1) においても、49-52°C 付近に HT の融解に由来する吸熱ピークが観察された (Fig.5 e-g, Fig.6 e, f, Fig.7 e, f)。このことから、GM (HT/ α CD=1/1)、GM (HT/ β CD=2/1) および GM (HT/ γ CD=2/1) は CD に対して、過剰の HT が存在すると推察された。一方、GM (HT/ α CD=1/2 および HT/ α CD=1/3) および GM (HT/ β CD=1/1 および HT/ β CD=1/2) および GM (HT/ γ CD=1/1 および HT/ γ CD=1/2) では、HT の融解に由来する吸熱ピークは確認されなかった (Fig.5 h, i, Fig.6 g, h, Fig.7 g, h)。

ゲスト分子と CD との調製物において、ゲスト分子の吸熱ピークの消失が見られた場合、非晶質性を有する包接錯体が形成されたことを示しているとの報告がある^{55, 56)}。よって、HT の融解由来の吸熱ピークの低温シフトや熱量の減少などは、粉碎による機械的なエネルギーが加わることで働くメカノケミカル効果が寄与していると推察された。また、ゲスト分子の熱的挙動の変化は、固体分散体中のゲストと CD の包接錯体または異なる特性を有する包接複合体の形成を示しているとの報告がある⁵⁷⁾。よって、混合粉碎物で確認された熱的挙動の変化は、HT/CDs 混合粉碎物における分子間相互作用が起因していると推察された。これらの結果は、混合粉碎によってモル比 HT/ α CD=1/2、HT/ β CD=1/1 および HT/ γ CD=1/1 で分子間相互作用している可能性があることを示している。

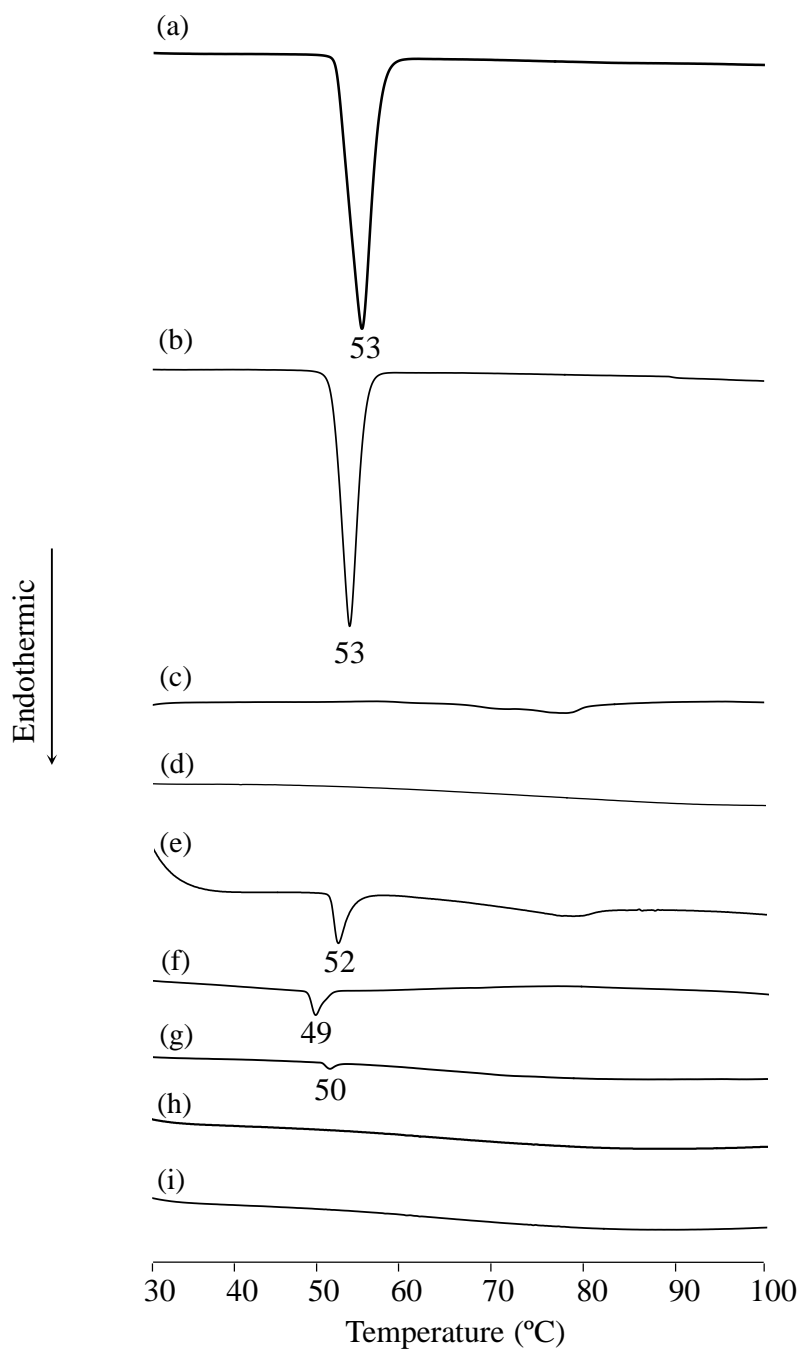


Fig. 5 DSC curves of HT/αCD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) αCD, (d) αCD ground, (e) PM (HT/αCD=1/1), (f) PM (HT/αCD=1/2), (g) GM (HT/αCD=1/1), (h) GM (HT/αCD=1/2), (i) GM (HT/αCD=1/3).

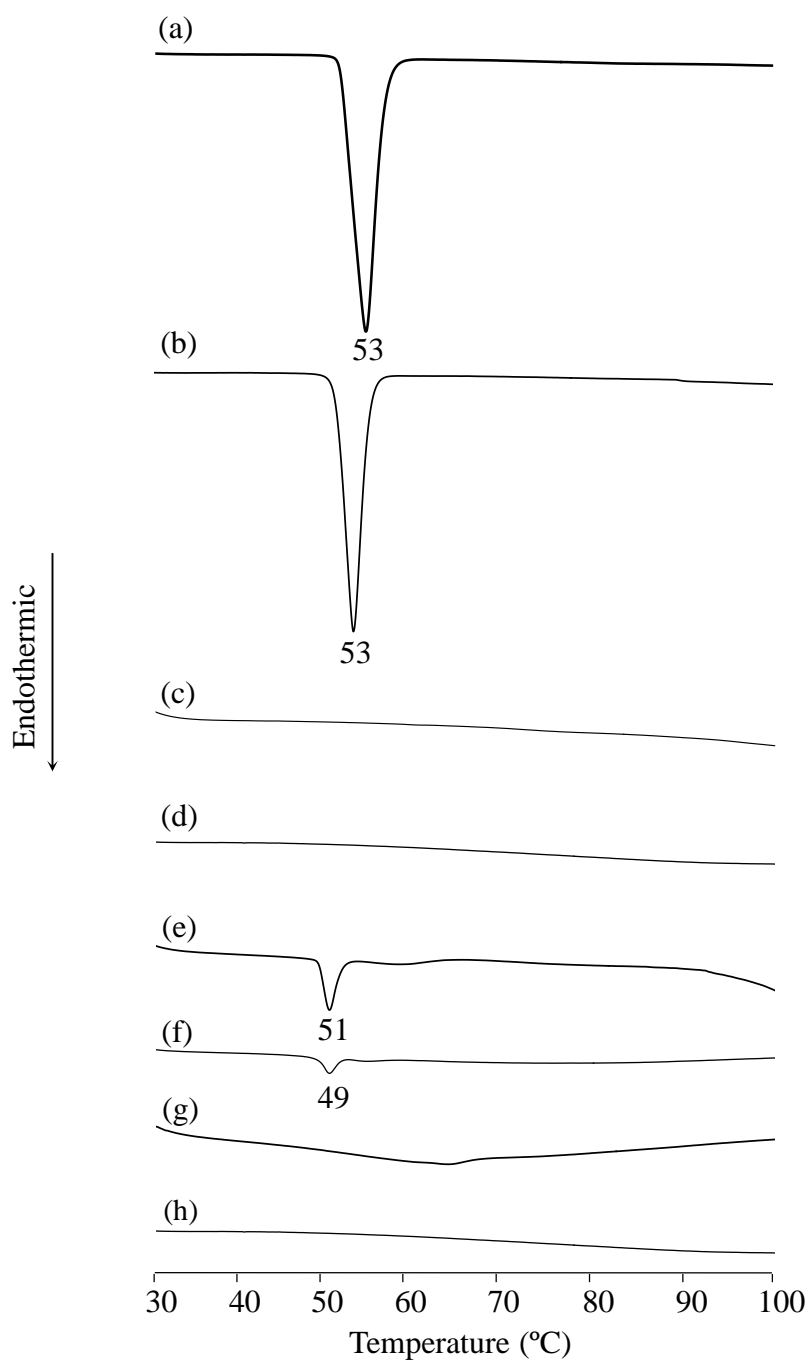


Fig. 6 DSC curves of HT/ β CD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) β CD, (d) β CD ground, (e) PM (HT/ β CD=1/1), (f) GM (HT/ β CD=2/1), (g) GM (HT/ β CD=1/1), (h) GM (HT/ β CD=1/2).

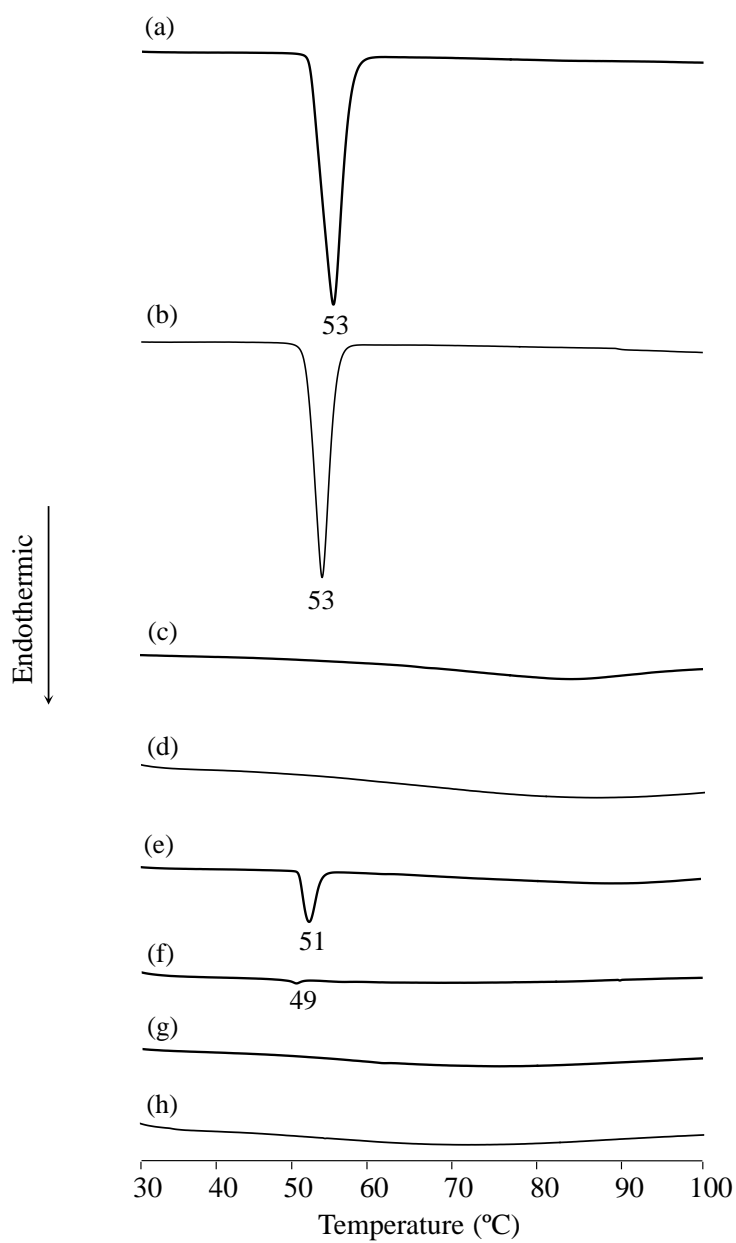


Fig. 7 DSC curves of HT/ γ CD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) γ CD, (d) γ CD ground, (e) PM (HT/ γ CD=1/1), (f) GM (HT/ γ CD=2/1), (g) GM (HT/ γ CD=1/1), (h) GM (HT/ γ CD=1/2).

精油成分と CD との分子間相互作用により、ゲスト分子である精油成分の熱安定性を向上することが報告されている。HT は精油成分・低沸点物質であるため、TG 測定により複合体形成に伴う HT 分子の重量変化について検討を行った (Fig.8)。

HT 単独および HT 単独粉砕物において 50.6°C 付近から約 99%の HT 結晶由来の重量減少が確認された (Fig.8 a, b)。CD では、280°C 付近から 380°C による、 α CD (74.5%)、 β CD (67.4%)、 γ CD (74.7%)、PM (HT/ α CD=1/2) は 70.0%、PM (HT/ β CD=1/1)は 70.2%および PM (HT/ γ CD=1/1) は 70.5%の重量減少が確認された (Fig.8 c-h)。一般的に、CD は約 270°C 付近から CD の熱分解由来の重量減少が観察されることが知られている⁵⁸⁾。よって、 α CD、 β CD、 γ CD、PM (HT/ α CD=1/2)、PM (HT/ β CD=1/1) および PM (HT/ γ CD=1/1)で観察された 280°C 付近から 380°C による重量減少は、CD の熱分解由来によるものと推察した。また、30-120°C 付近に α CD で 9.6%、 β CD で 12.8%、 γ CD で 8.0%、PM (HT/ α CD=1/2) は 12.0%、PM (HT/ β CD=1/1) は 7.0%、PM (HT/ γ CD=1/1) は 9.9%、GM (HT/ α CD=1/2) は 8.5%、GM (HT/ β CD=1/1) は 9.6%および GM (HT/ γ CD=1/1) は 5.8%の重量減少が確認された。CD 単独、物理的混合物および混合粉砕物で確認された 30-120°C 付近の重量減少は、TG 曲線の減少度合から推定して、CD の結晶水または付着水の蒸発に由来するものと推察した。

Daniel によると、低融点物質で 110°C 付近以降に観察される重量減少は、形成された複合体由来の揮発抑制によるものであるとされている⁵⁹⁾。混合粉砕物において観察されたそれぞれの重量減少は、HT/CDs 複合体形成によるものであると推察された。これらの結果より、HT/CDs 複合体の熱安定性による、HT の揮発抑制が起きたものと推察された。

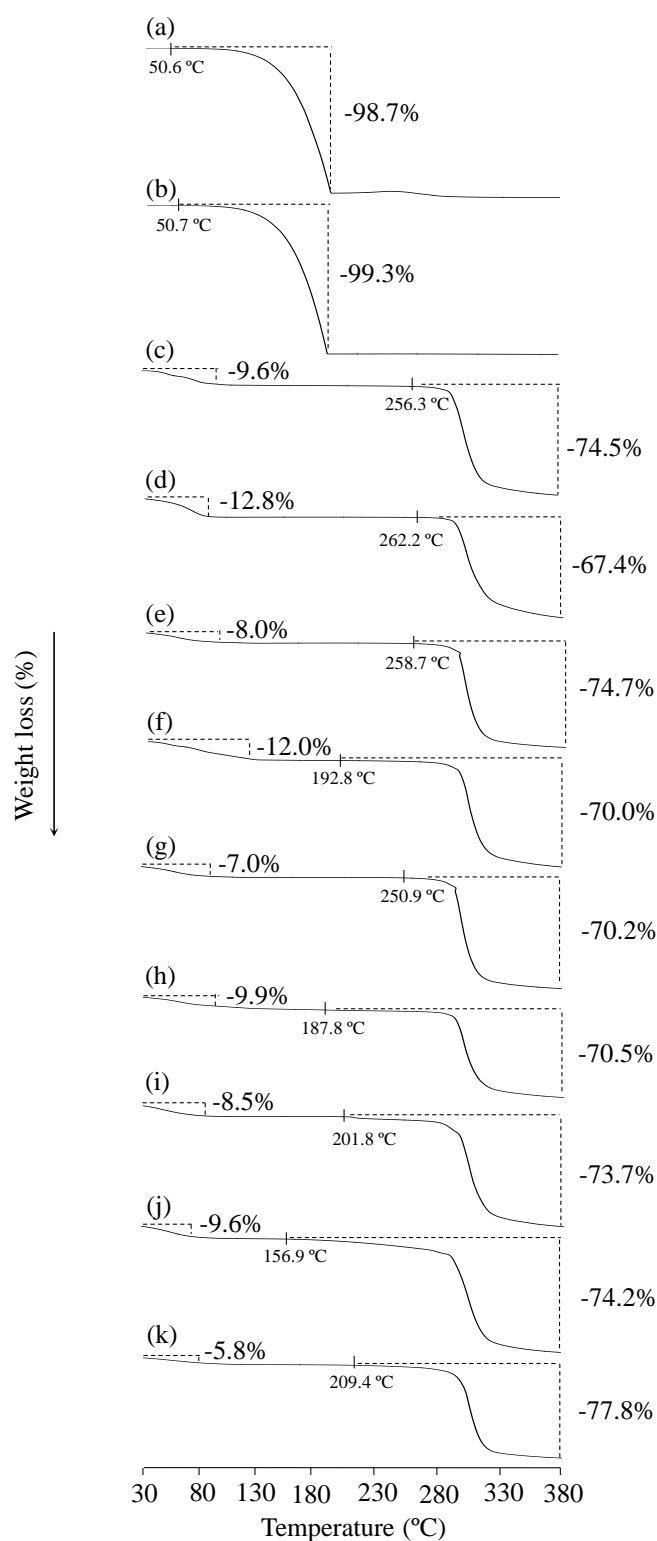


Fig. 8 TG curves of HT/CDs systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) α CD, (d) β CD, (e) γ CD, (f) PM (HT/ α CD=1/2), (g) PM (HT/ β CD=1/1), (h) PM (HT/ γ CD=1/1), (i) GM (HT/ α CD=1/2), (j) GM (HT/ β CD=1/1), (k) GM (HT/ γ CD=1/1).

1-4 HT と CDs との包接モル比の検討

PXRD 測定、DSC 測定および TG 測定の結果より、60 分間混合粉砕物において HT/CDs 複合体形成が確認された。そこで、HT/ α CD、HT/ β CD および HT/ γ CD 包接化合物形成のモル比を検討するために、Dimethyl sulfoxide- d_6 (DMSO- d_6) を溶媒に用い、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定を行った (Fig.9-11)。

HT 単独は、1.1 ppm 付近にイソプロピル基 ($-\text{CH}_3$) のプロトンに由来するシグナル、6.9-7.3 ppm 付近に七員環のプロトンに由来するシグナルがそれぞれ観察された (Fig.9 a)。

CD は、一般的に 3-4 ppm 付近に CD の空洞外に位置する H-2 および H-4、空洞内に位置する H-3、H-5 および H-6 由来のシグナルが現れることが知られている⁶⁰⁾。また、4.9 ppm 付近には、H-1 由来のシグナルが現れることが知られている。 α CD、 β CD および γ CD は、グルコースユニットのプロトンに由来するシグナルが 3-4 ppm および 4.9 ppm 付近にそれぞれ観察された (Fig.9-11 b)。混合粉砕物 (GM (HT/ α CD=1/2)、GM (HT/ β CD=1/1) および GM (HT/ γ CD=1/1)) は、HT と CD 由来のシグナルがそれぞれ確認された。

GM (HT/ α CD=1/2) は、HT のイソプロピル基のプロトンに由来するシグナルは、1.1 ppm 付近に観察され、積分値が 0.51 であることから、GM (HT/ α CD=1/2) における HT の 1 プロトンあたりの積分値は 0.085 であることが確認された。また、 α CD のグルコースユニットの H-1 に由来するシグナルの積分値が 1 であることから、 α CD はグルコースユニットが 6 個であるため、1 プロトンあたりの積分値は 0.17 であることが確認された。

GM (HT/ β CD=1/1) は、HT のイソプロピル基のプロトンに由来するシグナルは、1.1 ppm 付近に観察され、積分値が 0.90 であることから、GM (HT/ β CD=1/1) における HT の 1 プロトンあたりの積分値は 0.15 であることが確認された。また、 β CD のグルコースユニットの H-1 に由来するシグナルの積分値が 1 であることから、 β CD はグルコースユ

ニットが 7 個であるため、1 プロトンあたりの積分値は 0.14 であることが確認された。

GM (HT/ γ CD=1/1) は、HT のイソプロピル基のプロトンに由来するシグナルは、1.1 ppm 付近に観察され、積分値が 0.760 であることから、GM (HT/ γ CD=1/1) における HT の 1 プロトンあたりの積分値は 0.127 であることが確認された。また、 γ CD のグルコースユニットの H-1 に由来するシグナルの積分値が 1 であることから、 γ CD はグルコースユニットが 8 個であるため、1 プロトンあたりの積分値は 0.125 であることが確認された。

各混合粉砕物のモル比を式(1)⁶¹⁾を用いて算出した。GM (HT/ α CD=1/2) の包接モル比を算出すると、HT/ α CD=1.00/2.00 であった。GM (HT/ α CD=1/2)は包接モル比が、HT/ α CD \approx 1/2 であることが確認された。GM (HT/ β CD=1/1) の包接モル比を算出すると、HT/ β CD=0.85/1.00 であった。GM (HT/ β CD=1/1)は包接モル比が、HT/ β CD \approx 1/1 であることが確認された。GM (HT/ γ CD=1/1) の包接モル比を算出すると、HT/ γ CD=1.02/1.00 であった。GM (HT/ γ CD=1/1)は包接モル比が、HT/ γ CD \approx 1/1 であることが確認された。また、DMSO- d_6 中の $^1\text{H-NMR}$ において全てのプロトン由来のシグナルが妥当な積分比で過不足なく観測されたことから、HT および CD が分解することなく試料中に存在することが確認された。

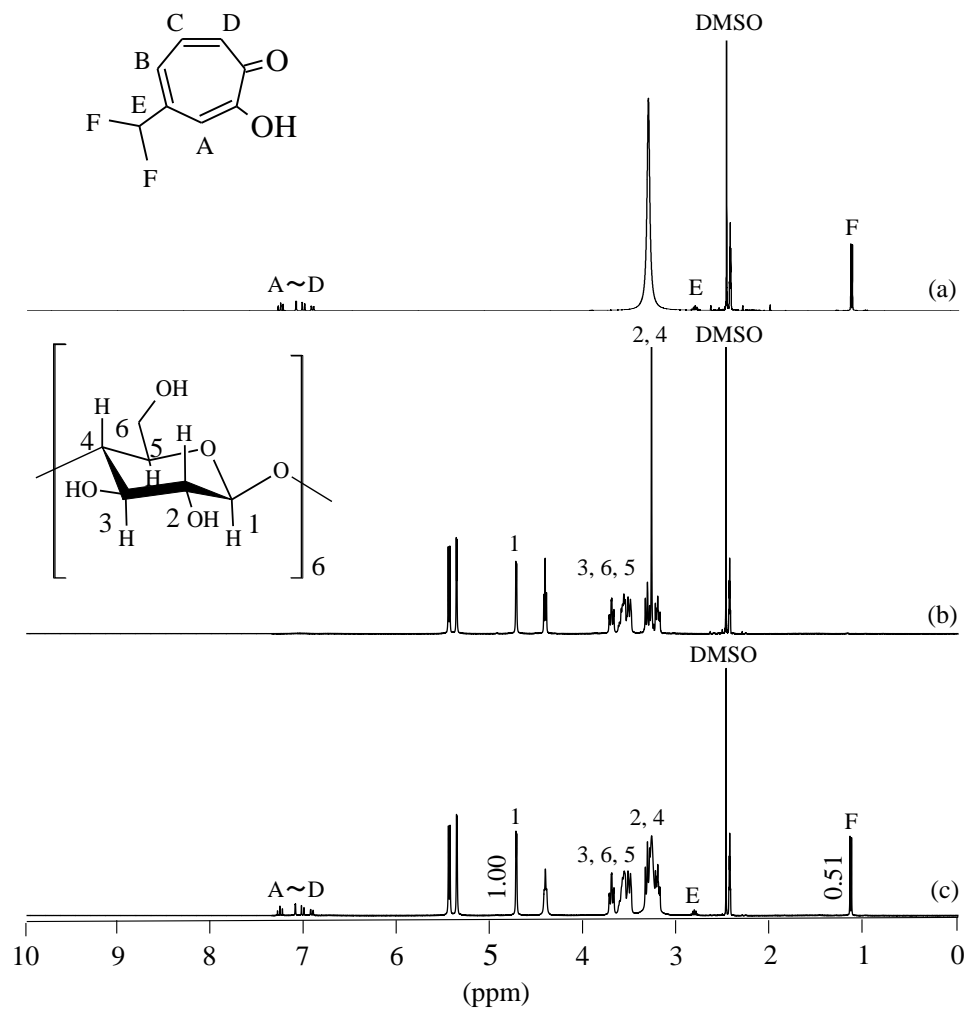


Fig. 9 ¹H-NMR (DMSO-d₆) spectra of HT/αCD systems.
 (a) HT intact, (b) αCD, (c) GM (HT/αCD=1/2).

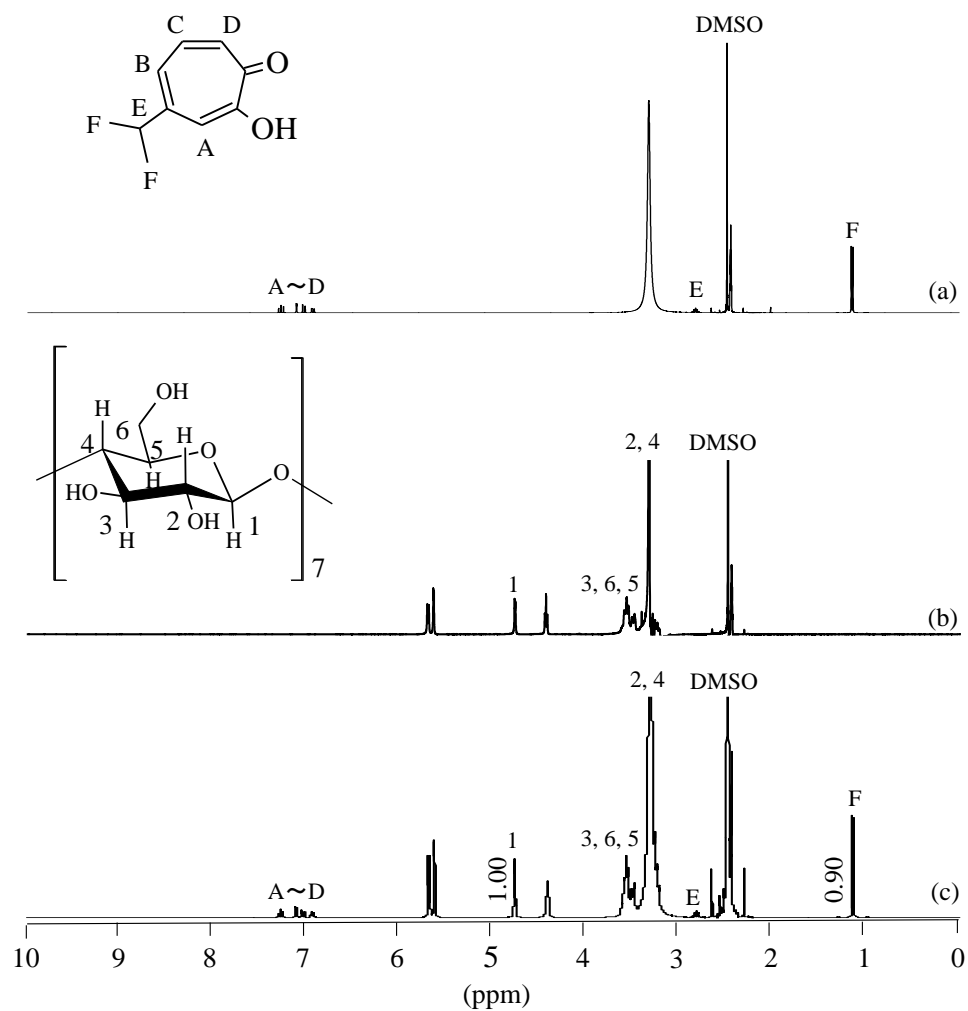


Fig. 10 ¹H-NMR (DMSO-d₆) spectra of HT/βCD systems.
 (a) HT intact, (b) βCD, (c) GM (HT/βCD=1/1).

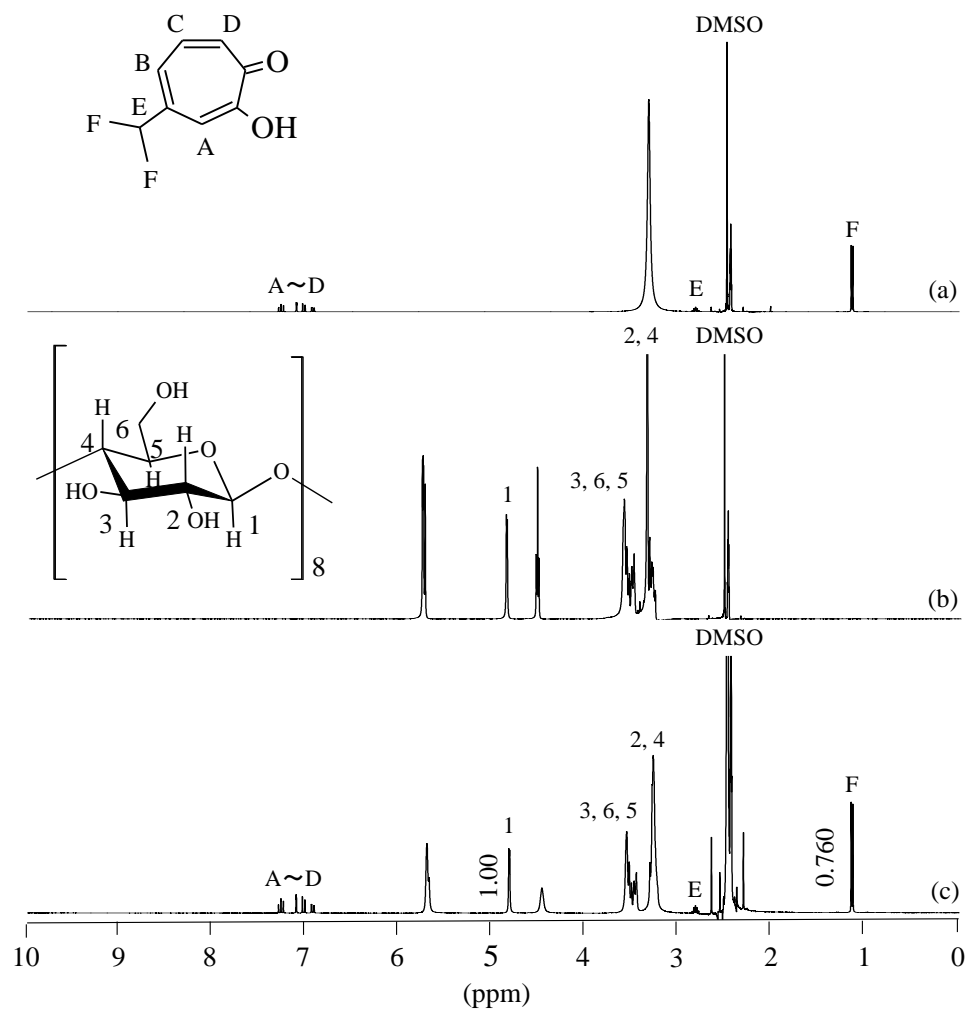


Fig. 11 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) spectra of HT/ γCD systems.
 (a) HT intact, (b) γCD , (c) GM (HT/ γCD =1/1).

1-5 固体状態における分子状態の検討

HT はトロポロン骨格を有するため、蛍光発光を示す。そのため、固体蛍光スペクトル測定は、HT と CD との分子間相互作用における分子状態を把握する上で有用な情報となる。そこで、複合体の固体状態における分子状態を検討するため、固体蛍光スペクトル測定を行った (Fig.12)。

Breheret らの報告によると、トロポロン骨格を有するトロポノイドは 420 nm 付近に蛍光発光を示すとの報告がある⁶²⁾。HT 単独において 420 nm 付近で観察された発光スペクトルは、トロポロン骨格由来のエキシマー (励起二量体) 蛍光であると推察した。HT 単独粉碎物においては、420 nm 付近のスペクトルと 404 nm 付近に肩スペクトルが観察された。404 nm 付近に確認された肩ピークは、HT の単独粉碎により一部モノマー化したことが起因したものと考えられる。GM (HT/ α CD=1/2) は、387 nm と 400 nm 付近と短波長側にスペクトルシフトが観察された。また、GM (HT/ β CD=1/1) では 402 nm 付近のスペクトルと 389 nm 付近の肩ピークと短波長側にスペクトルシフトが観察された。また、GM (HT/ γ CD=1/1) では 402 nm 付近にスペクトルが観察され、複合体形成による HT のモノマー化が推察された。しかしながら、GM (HT/ γ CD=1/1) は、420 nm 付近のスペクトルシフトが確認されなかった。GM (HT/ α CD=1/2) および GM (HT/ β CD=1/1) にて確認された短波長側のスペクトルシフトは、包接複合体形成による HT のモノマー蛍光であると推察された。また、モノマー蛍光の出現に伴い、HT 結晶で確認された 420 nm 付近の HT のエキシマー蛍光強度の減少が確認された。一般的に、トロポノイドの蛍光スペクトルの変化は、トロポロン骨格中のカルボニル基とヒドロキシ基で形成されている分子内水素結合の変化に起因することが報告されている⁶³⁾。このことから、GM (HT/ α CD=1/2) 、GM (HT/ β CD=1/1) および GM (HT/ γ CD=1/1) で観察された低波長側の発光スペクトルは、包接複合体形成に伴う、HT のモノマー化による電子状態変化が起因したものと考えられた。さらに、GM (HT/ α CD=1/2) は、2

つの α CD で HT を挟み込む状態で包接されているため、HT がよりモノマー化されたことが、電子密度の変化に大きく影響しているものと推察した。これより、HT のエキシマー分子とモノマー分子の割合が、用いる CD の種類により異なるものと推察された。さらに詳細な分子状態を評価するために、今後時間分解蛍光測定⁶⁴⁾を行い複合体形成反応の経時変化を追うことが必要と考えられる。

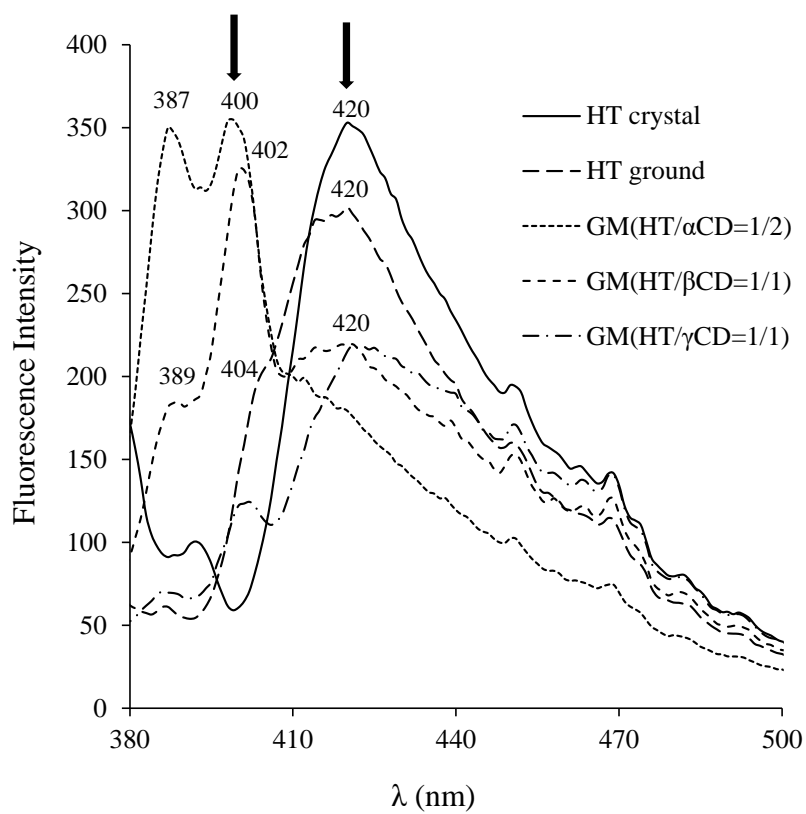


Fig. 12 Emission spectra of HT/CDs systems.
 $(\lambda_{ex} = 359 \text{ nm})$

FT-IR スペクトル測定は、固体状態での包接複合体の形成を確認するために有用な分析法である⁶⁵⁾。そこで、複合体中における分子状態を検討するために、FT-IR スペクトル測定を行った (Fig.13)。

FT-IR スペクトル測定の結果、HT 結晶において HT 分子構造中のカルボニル基 (1608 cm^{-1} 付近) およびヒドロキシ基 (3200 cm^{-1} 付近) に由来する吸収スペクトルが観察された (Fig.13 a)。HT 単独粉碎物では、HT 同様にカルボニル基 (1608 cm^{-1}) およびヒドロキシ基 (3211 cm^{-1}) に由来する吸収スペクトルが観察された (Fig.13 b)。 α CD 単独では、 1025 cm^{-1} (C-O-C 伸縮振動)、 1154 cm^{-1} (C-O 伸縮振動)、 1641 cm^{-1} (H-O-H 変角振動)、 2927 cm^{-1} (-C-H 伸縮振動)、 3398 cm^{-1} を中心として $3800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ 間にヒドロキシ基 (O-H 伸縮振動) 由来のブロードな吸収スペクトル⁶⁶⁾が確認された (Fig.13 c)。 β CD 単独では、 1023 cm^{-1} (C-O-C 伸縮振動)、 1160 cm^{-1} (C-O 伸縮振動)、 1652 cm^{-1} (H-O-H 変角振動)、 2926 cm^{-1} (-C-H 伸縮振動)、 3363 cm^{-1} を中心として $3800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ 間にヒドロキシ基 (O-H 伸縮振動) 由来のブロードな吸収スペクトル³⁴⁾が確認された (Fig.14 c)。 γ CD 単独では、 1031 cm^{-1} (C-O-C 伸縮振動)、 1159 cm^{-1} (C-O 伸縮振動)、 1653 cm^{-1} (H-O-H 変角振動)、 2928 cm^{-1} (-C-H 伸縮振動)、 3389 cm^{-1} を中心として $3800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ 間にヒドロキシ基 (O-H 伸縮振動) 由来のブロードな吸収スペクトル³⁴⁾が確認された (Fig.15 c)。PM (HT/ α CD=1/2) 、PM (HT/ β CD=1/1) および PM (HT/ γ CD=1/1) においても HT 分子構造中のカルボニル基およびヒドロキシ基に由来する吸収スペクトルが HT 結晶と同様に認められた (Fig.13-15 d)。一方、GM (HT/ α CD=1/2) では、HT 由来のカルボニル基 (C=O 伸縮) 由来の 1608 cm^{-1} 付近の吸収スペクトルが 1605 cm^{-1} に低波数シフトしていることが観察された (Fig.13 e)。GM (HT/ β CD=1/1) では、HT 由来のカルボニル基 (C=O 伸縮) 由来の 1608 cm^{-1} 付近の吸収スペクトルが 1616 cm^{-1} に高波数シフトしていることが観察された (Fig.14 e)。GM (HT/ γ CD=1/1) では、HT 由来のカルボニル基 (C=O 伸縮) 由来の 1608 cm^{-1} 付

近の吸収スペクトルが 1606 cm^{-1} に低波数シフトしていることが観察された (Fig.15 e)。さらに、GM (HT/ α CD=1/2) 、GM (HT/ β CD=1/1) および GM (HT/ γ CD=1/1) では、 3200 cm^{-1} に確認された HT のヒドロキシ基の吸収スペクトルの消失または高波数側へのシフトが確認された。CD はゲスト分子を包接していない時は水分子を取り込んでおり、そこへゲスト分子が近づくと水分子と入れ替わって安定なエネルギー状態になることが知られている⁶⁷⁾。本研究で、CD 単独で確認された 1653 cm^{-1} 付近の CD 空洞内に存在する結晶水に由来する吸収スペクトルが、混合粉砕物では消失もしくは強度の低下が確認された。一般的に CD 空洞内のヒドロキシ基と薬物との分子間相互作用により、包接体では水素結合が形成されている⁶⁸⁾。 1653 cm^{-1} 付近に確認された CD の空洞内に存在する結晶水に由来する吸収スペクトルが混合粉砕物では消失していたことから、結晶水の脱水による疎水性分子間相互作用が推察された。

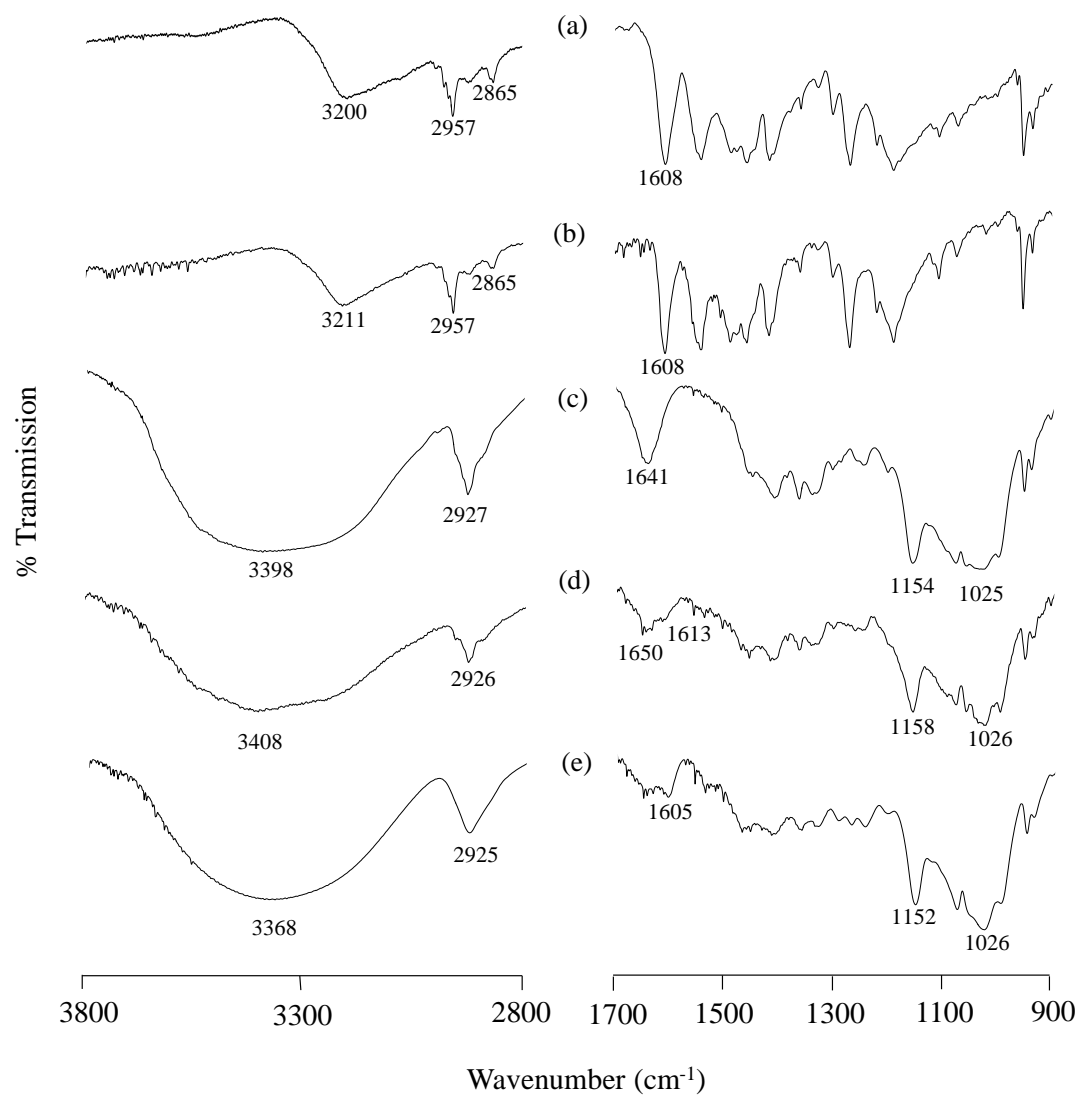


Fig. 13 FT-IR spectra of HT/ α CD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) α CD, (d) PM (HT/ α CD=1/2),
 (g) GM (HT/ α CD=1/2).

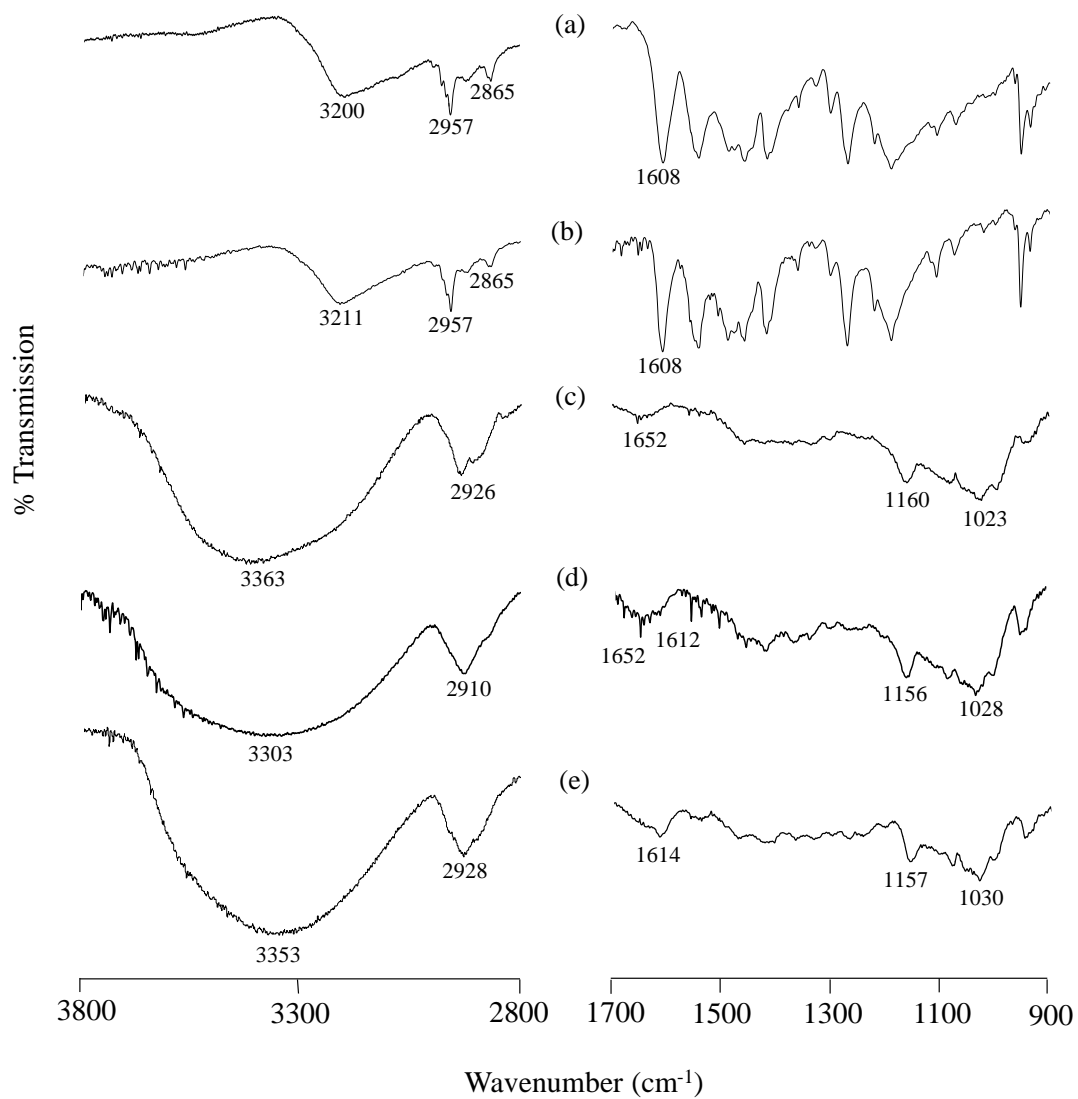


Fig. 14 FT-IR spectra of HT/βCD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) βCD, (d) PM (HT/βCD=1/1),
(e) GM (HT/βCD=1/1).

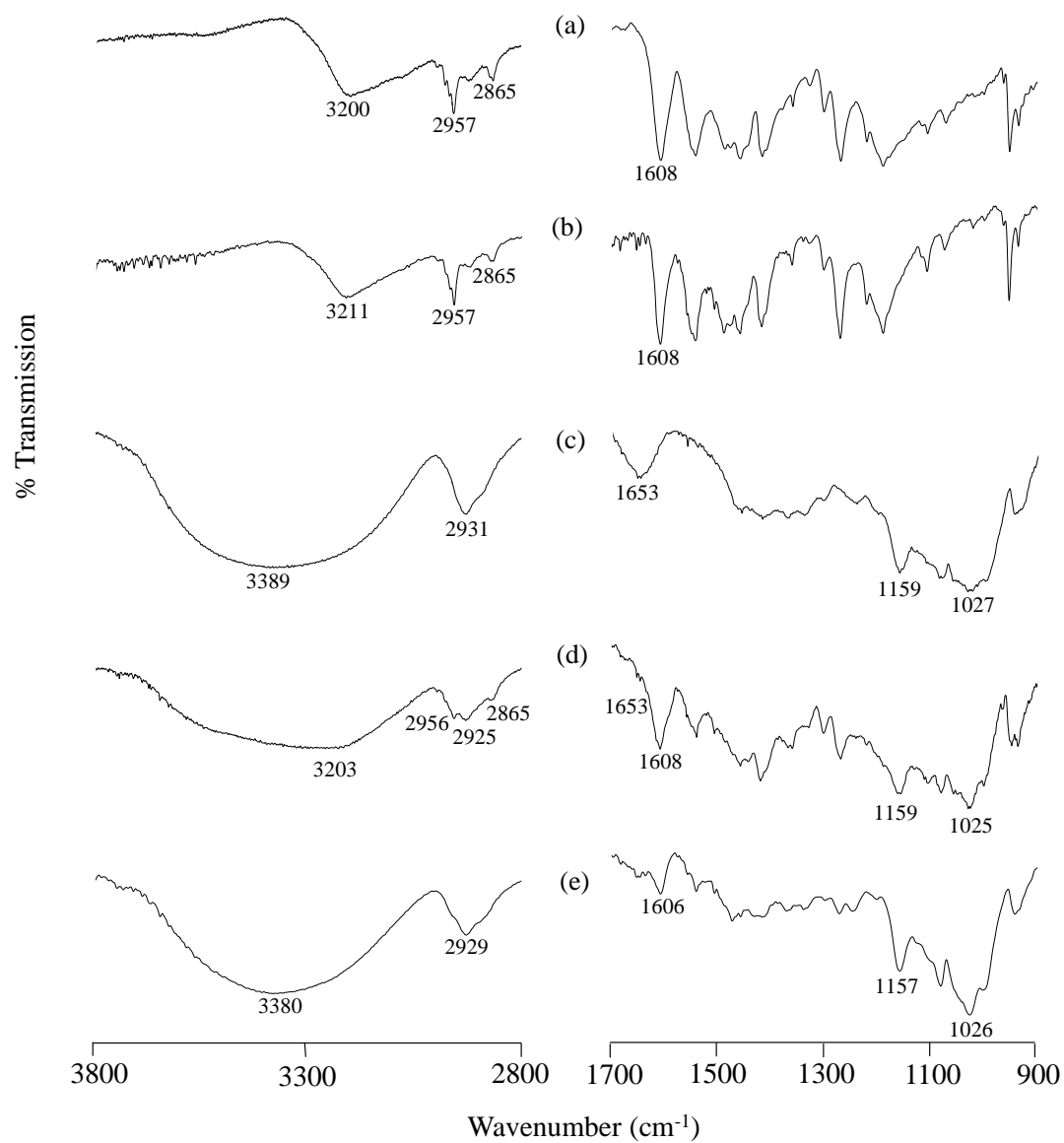


Fig. 15 FT-IR spectra of HT/γCD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) γCD, (d) PM (HT/γCD=1/1),
(e) GM (HT/γCD=1/1).

1-6 HT/CD 複合体からの HT 溶出性評価

固体状態の物性評価により、混合粉砕法による HT/ γ CD との分子間相互作用が推察された。一般的に、CD で難水溶性物質を包接することでゲスト分子の溶出性を向上することが報告されている^{69,70}。CD との複合体形成による HT の溶出性を確認するために、HT 結晶、HT 単独粉砕物、物理的混合物および混合粉砕物について蒸留水を用いて溶出試験を行った (Fig.16-18)。

溶出試験の結果、HT 結晶は初期の段階ではほとんど溶出せず、60 分値においても約 30%の溶出率であることが確認された。HT 単独粉砕物では、粉砕による HT の粒子径の減少により、HT 結晶と比較して初期の溶出率は立ち上がり早く、60 分値で約 50%の溶出率であった。PM (HT/ α CD=1/1)、PM (HT/ α CD=1/2)、PM (HT/ β CD=1/1) および PM (HT/ γ CD=1/1)では、HT が結晶として存在しているため、分散性が悪く、緩やかな溶出性が確認された。一方、GM (HT/ α CD=1/1) では、HT と α CD が部分的な相互作用が起きているため、初期に早い溶出性が確認された。しかしながら、60 分値でも HT の溶出率は 80%付近にとどまる結果となった。一方、GM (HT/ α CD=1/2) は 5 分値において 93%の溶出率を示し、初期の段階でほぼ HT が溶出することが確認された。また、GM (HT/ β CD=1/1) では 5 分値において 56%の溶出率を示し、立ち上がりが緩やかであり、時間経過に伴い徐々に溶出するプロファイルが得られた。GM (HT/ γ CD=1/1) は、5 分値において約 80%の溶出率を示し、立ち上がりの初期の段階でほぼ HT が溶出することが確認された。このことより、HT 結晶および物理的混合物と比較し、混合粉砕物において HT の溶出性の向上が認められた。また、物理的混合物と比較し、HT 単独粉砕物において HT の溶出性の向上が認められた。混合粉砕物における溶出性の向上は、HT 単独粉砕物において混合粉砕物同様の溶出性を示さなかったことより、単に粉砕のみによる影響ではないと考えられた。よって、HT と CD 間の分子間相互作用が溶出性向上に起因していると考えられた。ま

た、PXRD 測定の結果より、GM (HT/ α CD=1/2)、GM (HT/ β CD=1/1) および GM (HT/ γ CD=1/1)においては、ハローパターンを示したことから包接複合体形成による非晶質化が確認されている (Fig. 2-4)。包接複合体形成により、ゲスト分子が非晶質化することで溶解性が向上するとの報告があり^{71,72)}、HT と CD の包接複合体形成による HT の非晶質化が溶出性に反映したと推察した。

水溶液中における HT の溶解性が増大するのは、包接化による HT の見かけの溶解性が上がることが起因していると推察した。よって、CD の種類によって異なる HT の溶出挙動を示したのは、HT/CDs 複合体の包接様式の違いが寄与していると推察した。

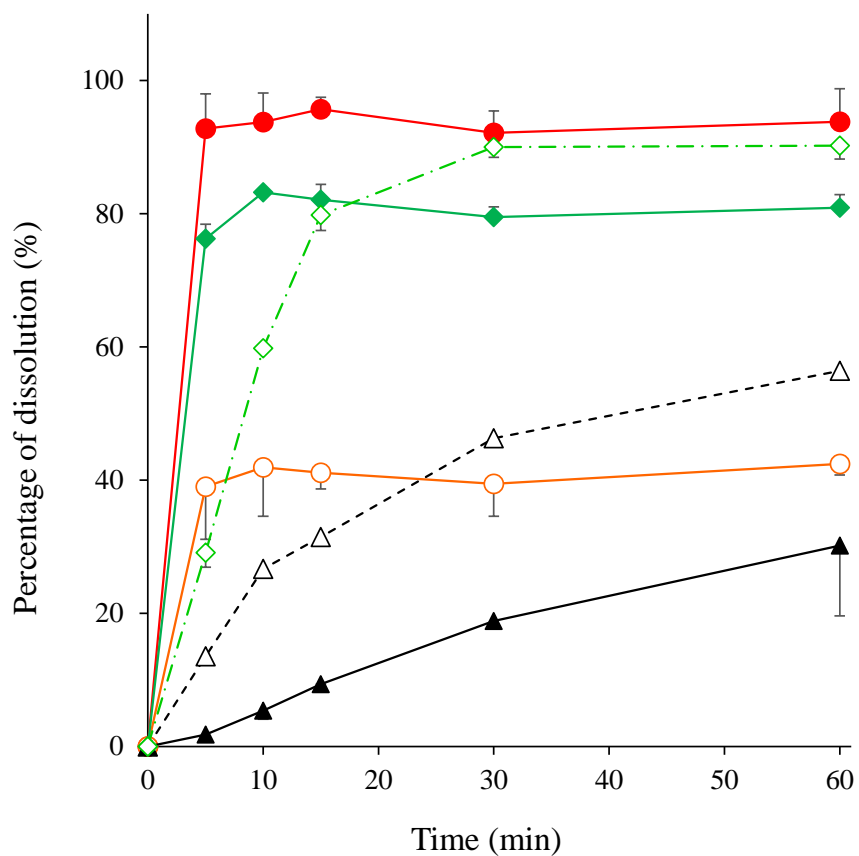


Fig. 16 Dissolution profiles of HT/ α CD systems ($37 \pm 0.5^\circ\text{C}$).

▲:HT intact, Δ :HT ground, \diamond :PM (HT/ α CD=1/1), \circ :PM (HT/ α CD=1/2),
 \blacklozenge :GM (HT/ α CD=1/1), \bullet :GM (HT/ α CD=1/2).

Results were expressed as mean \pm S.D. (n=3)

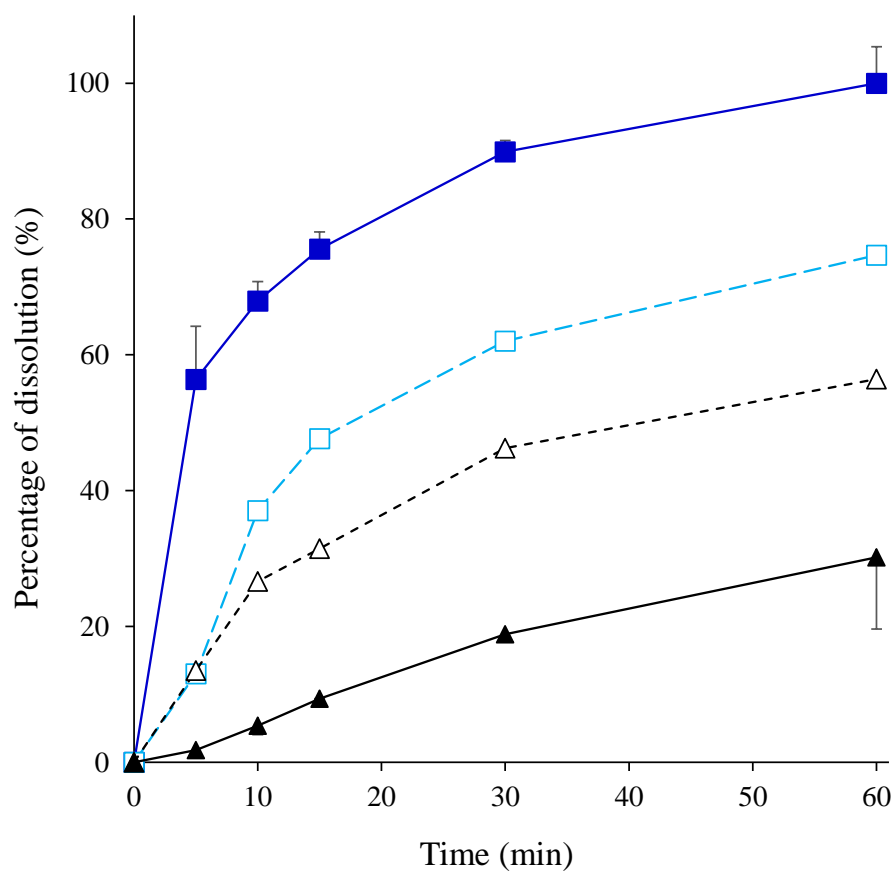


Fig. 17 Dissolution profiles of HT/ β CD systems ($37 \pm 0.5^\circ\text{C}$).

▲:HT intact, Δ :HT ground, \square :PM (HT/ β CD=1/1), \blacksquare :GM (HT/ β CD=1/1).

Results were expressed as mean \pm S.D. (n=3)

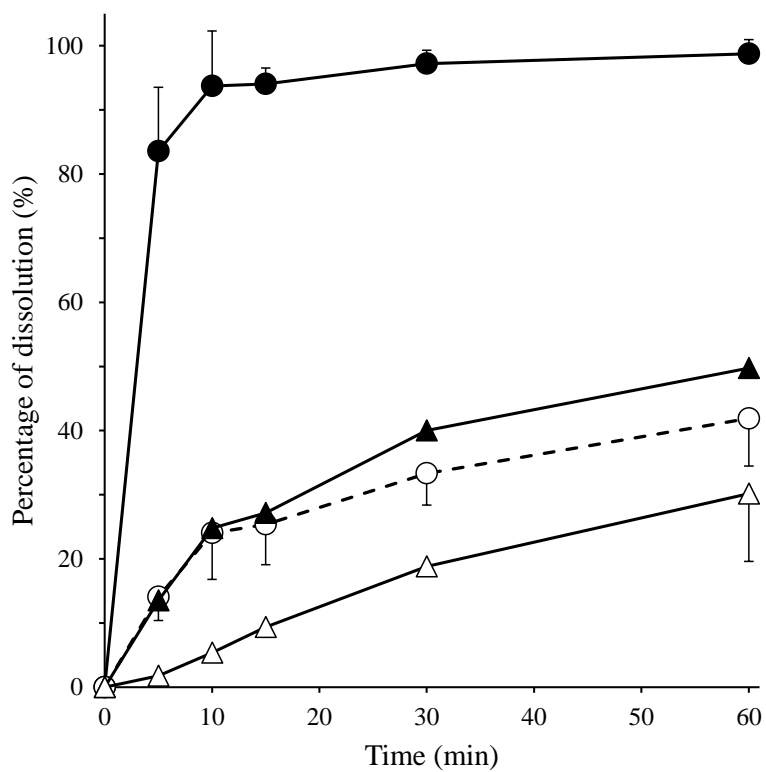


Fig. 18 Dissolution profiles of HT/γCD systems.

△:HT intact, ▲:HT ground, ○:PM (HT/γCD=1/1), ●:GM (HT/γCD=1/1).

Results were expressed as mean ± S.D. (n=3)

1-7 溶液状態における分子間相互作用の検討

溶出試験の結果から、混合粉砕物において HT 結晶と比較し溶出性の向上が確認され、溶液状態における HT と CD 間での分子間相互作用が溶出性に影響を与えた可能性が推察された。NMR スペクトル測定は、創薬分野への応用を考慮した溶液状態での構造解析に用いられる有用な手法である^{73,74)}。CD 空洞内にゲスト分子が包接されると、包接に関与している部位プロトン由来の NMR 化学シフト値の変動が確認される。これらの化学シフト変化およびゲスト分子と CD とのクロスピークを確認することで、詳細な包接部位を推定することができる。そこで、水溶液中における HT/CD の分子状態の評価を行うために ^1H - ^1H 2D-NMR 測定を行った。

^1H - ^1H COSY NMR スペクトル測定

HT/CD 複合体の構造解析を行うにあたり、HT 単独における ^1H - ^1H COSY NMR 測定を行った (Fig.19)。 ^1H - ^1H COSY NMR 測定は、HT のプロトンのカップリングの有無を確認するために実施した⁷⁵⁾。

HT 単独は、1.1 ppm 付近にイソプロピル基プロトン (H-F)、2.8 ppm 付近に H-E および 7.1-7.4 ppm 付近に七員環プロトン (H-A, -B, -C および-D) 由来のピークがそれぞれ確認された。HT は、H-F と H-E、H-B と H-C および H-C と H-D 間でそれぞれクロスピークが確認された。このことから、これらのプロトン間でカップリングがあることが確認された。つまり、H-F と H-E、H-B と H-C および H-C と H-D は、結合を介した近い位置に存在することが明らかとなった。

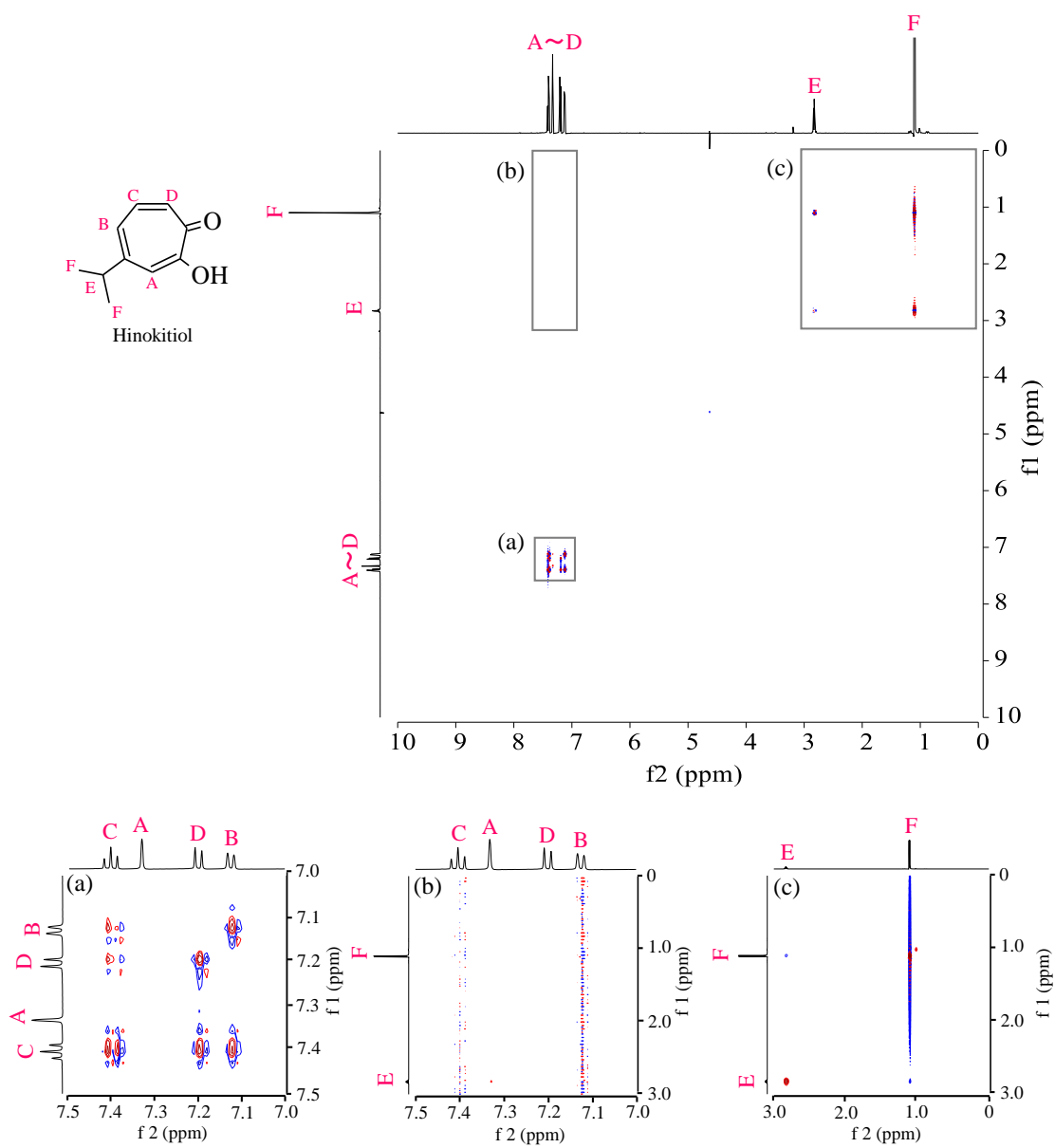


Fig. 19 ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of HT intact.

(a) HT intact X is 7.0-7.5 and the Y axis is 7.0-7.5, (b) HT intact X is 7.0-7.5 and the Y axis is 0-3.0, (c) HT intact X is 0-3.0 and the Y axis is 0-3.0.

^1H - ^1H NOESY NMR スペクトル測定

2D NMR スペクトル測定は、分子間双極子相互相関を観察することで、ゲスト分子と CD との立体的な構造配置を評価することができる^{76, 77)}。そこで、HT/CD 複合体における、HT と CD の空間的配置を検討するために ^1H - ^1H NOESY, ROESY NMR スペクトル測定を行った⁷⁸⁾ (Fig.20-24)。

HT 単独の ^1H - ^1H NOESY NMR スペクトル測定を行った結果を Fig.20 に示す。HT 単独の場合、H-A、H-B と H-E、H-B、H-D と H-C および H-F と H-E 間でそれぞれ分子内相関ピークが確認された。それぞれ確認された相関ピークは、HT の構造上妥当な配置であり、HT のプロトンの帰属を裏付けるものであった。

GM (HT/ α CD=1/2) は、HT の分子内相関ピークに加えて、HT の七員環のプロトンに由来する H-A、-B および -C ピークと α CD の H-3 ピーク間、HT のイソプロピル基のプロトンに由来する H-F ピークと α CD の H-3 および H-5 ピーク間でクロスピークが観察された (Fig.22)。また、GM (HT/ α CD=1/1) は、HT の分子内相関ピークに加えて、HT の七員環に由来する H-A および H-B ピークと α CD の H-3 ピーク間、HT のイソプロピル基に由来する H-F ピークと α CD の H-3 および H-5 ピーク間でクロスピークが観察された (Fig.21)。一方、GM (HT/ β CD=1/1) では、HT の分子内相関ピークに加えて、HT の七員環のプロトンに由来する H-A、-B および -C ピークと β CD の H-3、および H-5 ピーク間、HT のイソプロピル基のプロトンに由来する H-F ピークと β CD の H-3 および H-5 ピーク間でクロスピークが観察された (Fig.23)。GM (HT/ γ CD=1/1) では、HT の分子内相関ピークに加えて、HT の七員環に由来する H-A、H-B、H-C および H-D と γ CD の H-6 ピーク間、HT のイソプロピル基に由来する H-F ピークと γ CD の H-3、H-5 および H-6 ピーク間でクロスピークがそれぞれ確認された (Fig.24)。

^1H - ^1H ROESY NMR 測定の結果より、GM (HT/ α CD=1/2) は 2 つの α CD の空洞内に HT が存在しており、HT の七員環部分の一部が α CD の広い縁の近くに位置するこ

とが推察された。また、HT のイソプロピル基が CD の空洞内に位置しており、 α CD の広い縁の近くに位置することが推察された。一方、GM (HT/ β CD=1/1) では HT の七員環が空洞内に入っており、HT の七員環部分が β CD の狭い縁の近くに位置することが推察された。また、HT のイソプロピル基が CD の空洞内に入っており、広い縁の近くに位置することが推察された。このことより、GM (HT/ α CD=1/2) は、2 つの α CD の空洞の広い縁に浅く位置していることが推察された。また、GM (HT/ β CD=1/1) では HT の七員環部分より CD 空洞内に入っており狭い縁付近に位置し、広い縁に HT のイソプロピル基が位置しているものと推察された。HT/ γ CD 混合粉砕物では、HT は γ CD の空洞内に位置しており、HT の七員環部分が γ CD の狭い縁の近くに位置することが推察された。また、HT のイソプロピル基が CD の空洞内に入っており、広い縁の近くに位置することが推察された。よって、HT が γ CD で包接されることによる HT 間での空間的配置が変化したことが起因している⁷⁹⁾と推察された。以上の結果より、HT/ α CD、HT/ β CD および HT/ γ CD は異なる包接様式であることが推察された。

Lis-Cieplak らの報告によると、ゲスト分子としてアマンタジンを用いた場合、 ^1H - ^1H ROESY NMR 測定の結果から、包接の深さは α 、 β および γ CD の空洞径の大きさの違いが影響し、用いる CD によって異なる包接様式を取ることが知られている⁸⁰⁾。本研究で形成された包接様式の違いは、CD の空洞径の違いが影響しているものと考えられ、 α CD は空洞径が β CD および γ CD と比較して狭いため、HT が 1 つの CD 空洞内の深部まで入りきらず、2 つの CD の広い縁で HT を挟み込むように包接安定化しているものと推察された。また、 β CD および γ CD は空洞径が α CD と比較して広いため、HT が β CD の空洞内の深部にまで入り込んでおり、HT のサイズに適した空洞径であるため、安定な分子状態を維持しているものと推察された。また、Miletic らによると、ポリコナゾールと異なる CD を用いて包接複合体を形成した場合、包接様式の違いおよび粒子サイズの違いが溶出性に影響するとの報告がある⁸¹⁾。

以上の結果より、包接様式および安定な分子状態の違いが HT の溶出性に影響したものと推察された。また、溶出試験の結果において、GM (HT/ α CD=1/1) は試験開始初期に HT 高い溶解性を示すの溶出プロファイルが得られたのは、HT が部分的に包接されているため⁸²⁾であることが推察された。HT/CDs 複合体の構成する包接様式に応じて、HT の分子状態が異なり、それぞれの複合体における HT の溶出挙動に影響を与えたと推察した。

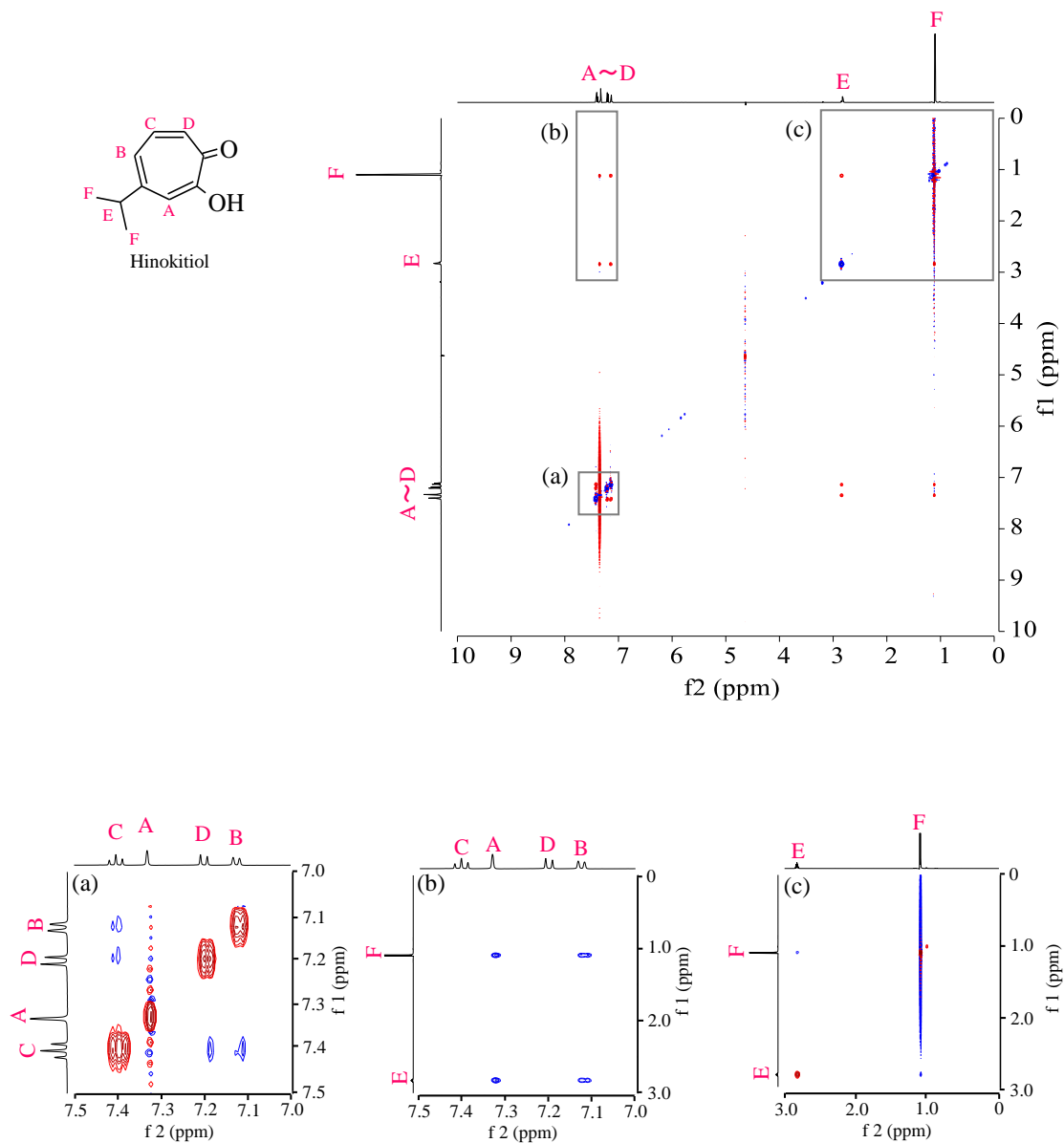


Fig. 20 ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum of HT intact.

(a) HT intact X is 7.0-7.5 and the Y axis is 7.0-7.5, (b) HT intact X is 7.0-7.5 and the Y axis is 0-3.0, (c) HT intact X is 0-3.0 and the Y axis is 0-3.0.

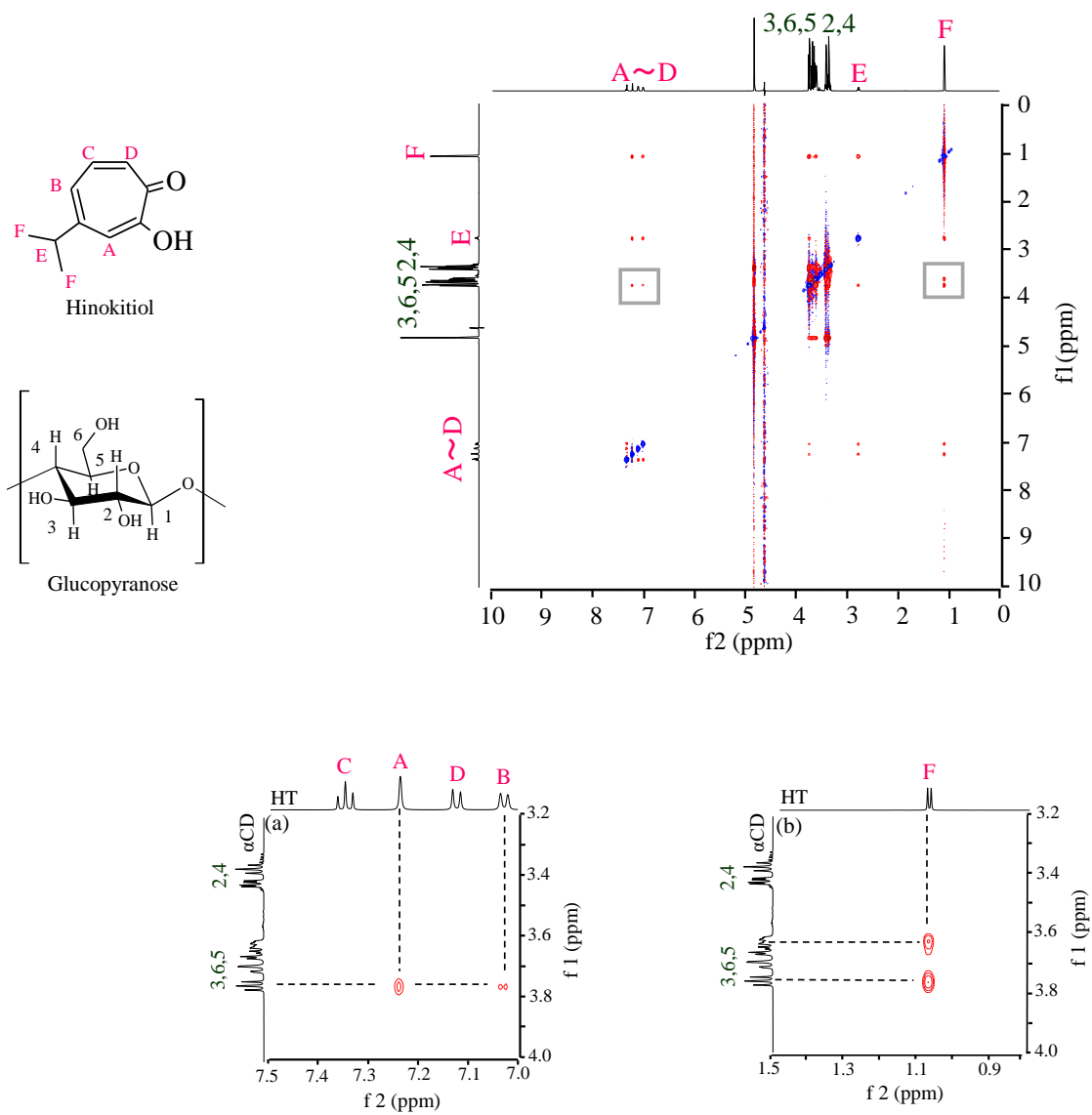


Fig. 21 ^1H - ^1H ROESY NMR spectrum of GM (HT/ α CD=1/1).

(a) GM (HT/ α CD = 1/1) X is 7.0-7.5 and the Y-axis is 3.2-4.0;

(b) GM (HT/ α CD = 1/1) X is 0.8-1.5 and the Y-axis is 3.2-4.0.

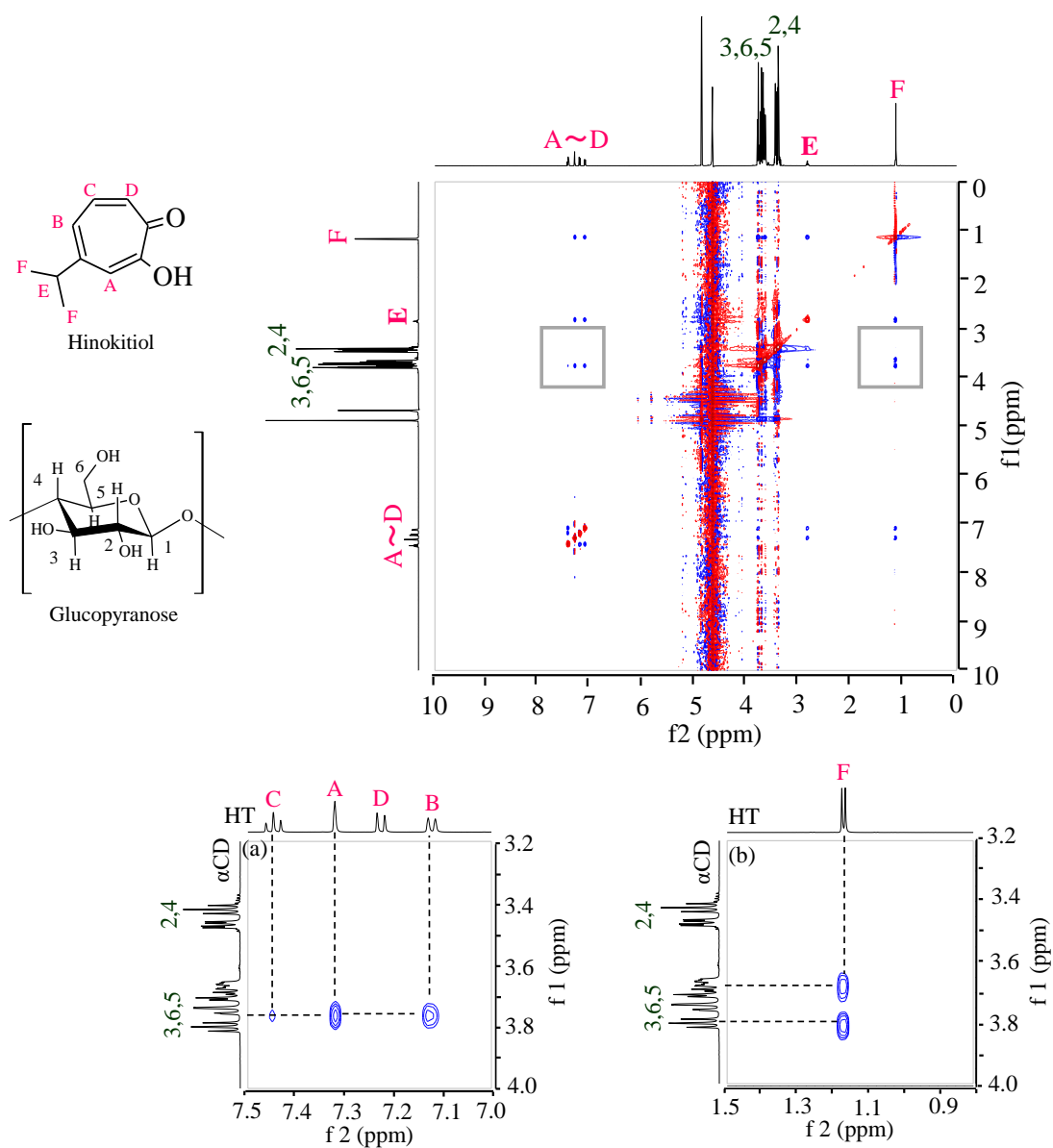


Fig. 22 ^1H - ^1H ROESY NMR spectrum of GM (HT/ α CD=1/2).

(a) GM (HT/ α CD = 1/2): X is 7.0-7.5 and the Y-axis is 3.2-4.0;

(b) GM (HT/ α CD = 1/2): X is 0.8-1.5 and the Y-axis is 3.2-4.0.

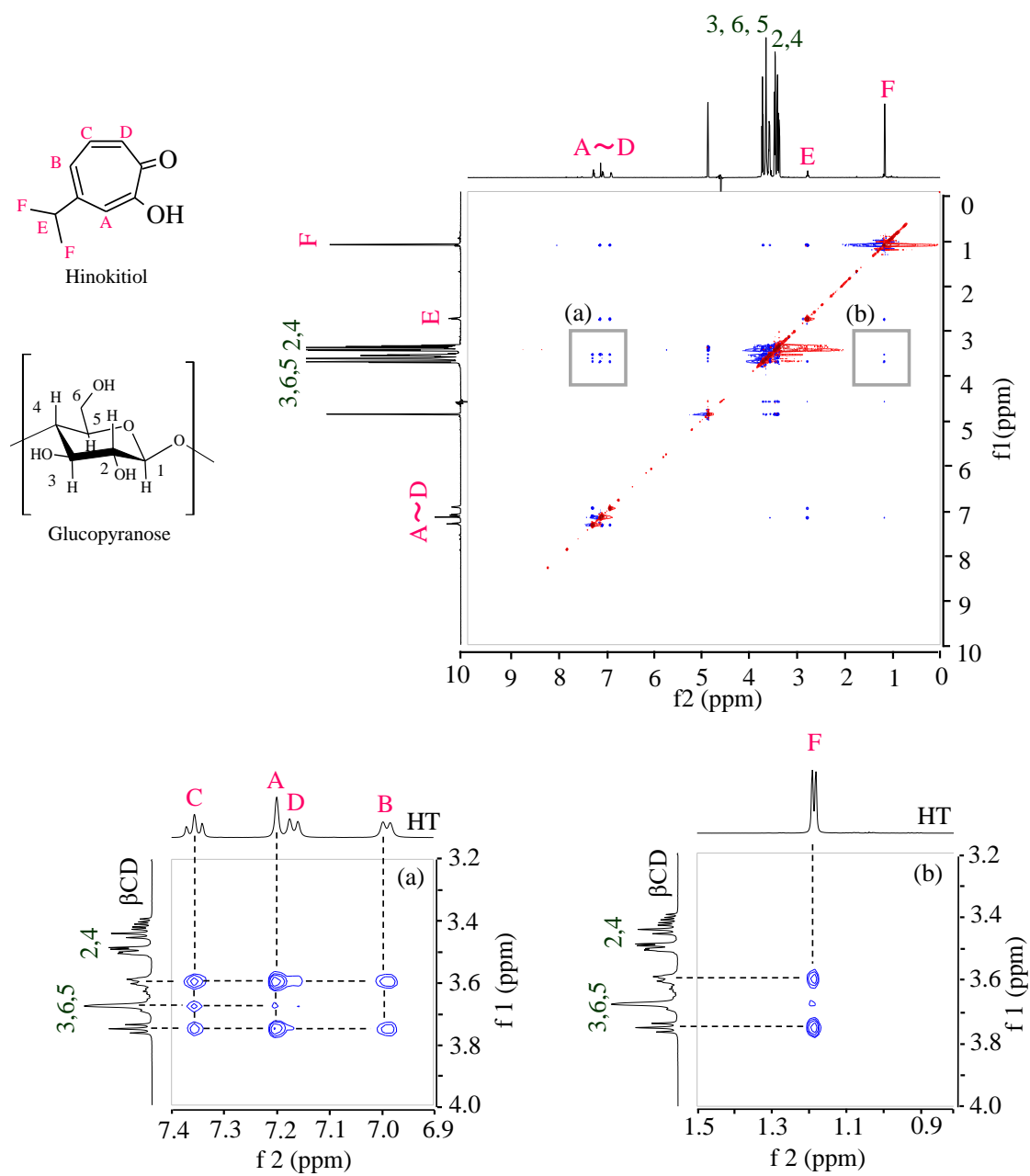


Fig. 23 ^1H - ^1H ROESY NMR spectrum of GM (HT/ β CD=1/1).

(a) GM (HT/ β CD =1/1): X is 6.9-7.4 and the Y-axis is 3.2-4.0;

(b) GM (HT/ β CD =1/1) X is 0.8-1.5 and the Y-axis is 3.2-4.0.

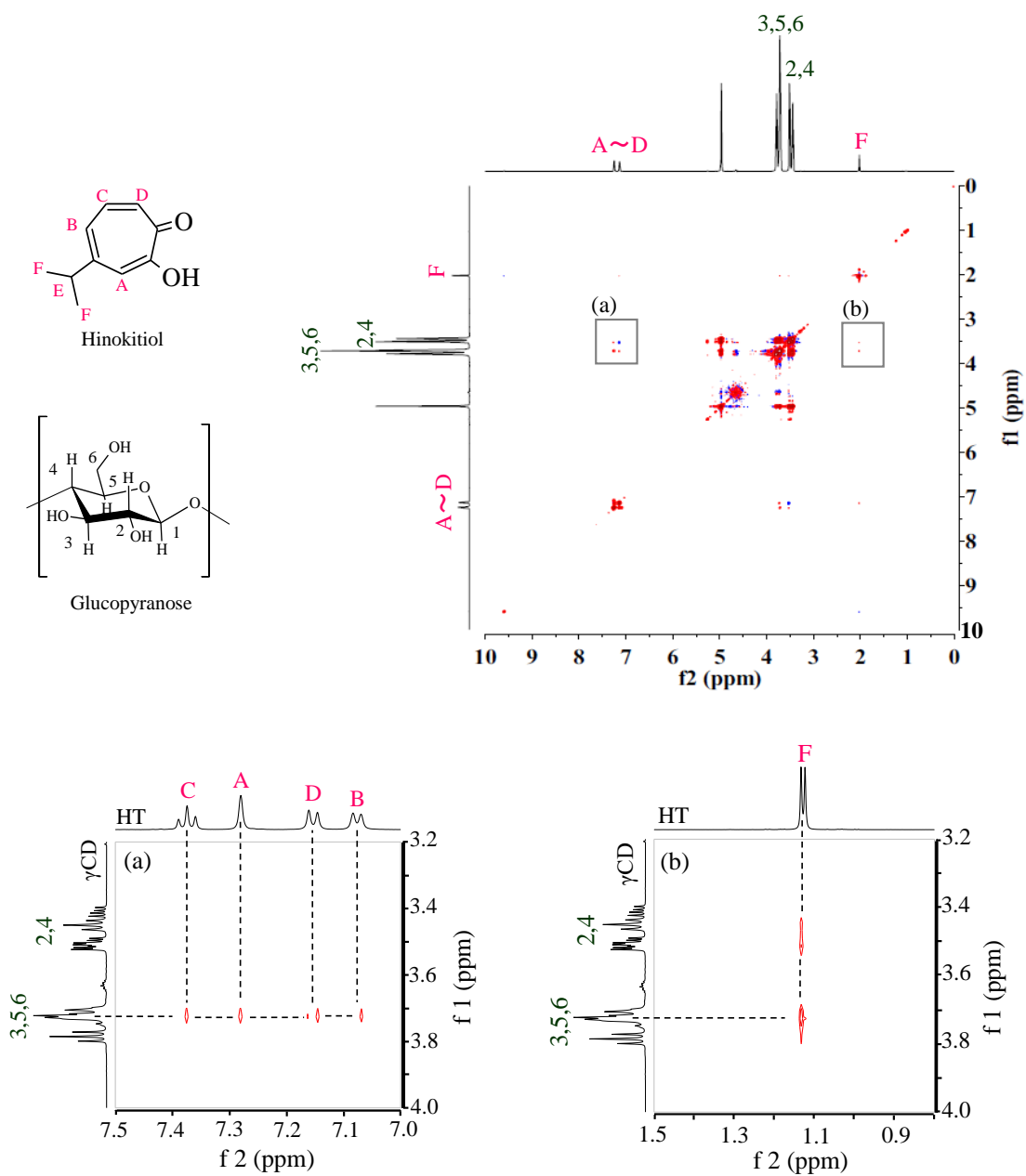


Fig. 24 ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum of HT/ γCD .

- (a) GM (molar ratio of HT/ γCD = 1/1) X is 7.0-7.5 and the Y axis is 3.2-4.0,
 (b) GM (molar ratio of HT/ γCD = 1/1) X is 0.8-1.5 and the Y axis is 3.2-4.0.

第1節 小括

第1節において、混合粉碎法によるメカノケミカル効果によって、HT/ α CD、HT/ β CDおよびHT/ γ CD包接複合体形成が確認され、包接複合体のモル比は HT/ α CD=1/2、HT/ β CD=1/1およびHT/ γ CD=1/1であることが明らかとなった。HT単独と比較し、HT/ α CD=1/2、HT/ β CD=1/1およびHT/ γ CD=1/1においてHTの溶出性向上が認められた。

溶液状態の評価としてD₂Oを溶媒として用いて測定した、¹H-¹H ROESY NMR測定の結果、HT/ α CD=1/2はHTの七員環部分の一部と、HTのイソプロピル基が2つの α CDの広い縁にリンクして包接していることが示された。また、HT/ β CDはHTの七員環部分が β CDの狭い縁とHTのイソプロピル基が広い縁と相互作用していることが示された。¹H-¹H NOESY NMR測定の結果、HTの七員環およびイソプロピル基が γ CD空洞内に位置することが推察された。この包接様式の違いは、CDの空洞径の違いが寄与していると推察された。したがって、 α CD、 β CDおよび γ CDでは、サイズ選択的にHTと複合体を形成することが確認された。

各HT/CDsにおける溶出挙動の違いは、各CDとの包接様式が反映されたことが明らかとなった。以上より、混合粉碎法を用いてHT/CDs複合体が調製可能となり、利用目的に応じて使用するCDを選択することで、HTの放出タイミングをコントロールすることが可能となり、今後のHTの利用拡大に繋がるであろう。

第2節 混合粉碎法によるHTとCD誘導体における複合体形成の検討

第2節 序

第1節において、HTと α 、 β および γ CDとの包接複合体形成が明らかとなった。それぞれの複合体におけるHTの分子状態が異なることが確認され、CDの空洞径のサイズの違いおよび疎水性の違いなどが影響している可能性が考えられた。CDには、多くの誘導体が存在し、医薬品、食品および化粧品分野など様々な分野で利用応用されている。例えば、ヒドロキシプロピル β シクロデキストリン (HP β CD)、メチル化 β シクロデキストリン (M β CD)、トリアセチル化 β シクロデキストリン (TA β CD)などが知られている。HP β CDは、低毒性で高い水溶性および包接能力により、薬物の可溶化および安定化を目的として医薬品分野において広く研究されているヒドロキシアルキル化 β シクロデキストリンである。M β CDは、水および有機溶媒に可溶性を示す特徴を有する。このような特性は、医薬品分野において薬物のバイオアベイラビリティ向上および薬物放出速度の調整へと応用することができる。また、M β CDは、他のCDと比較して高い表面張力を有することも特性のひとつである。TA β CDは、疎水性CD誘導体であり、半減期の短い薬物を包接することで、疎水的特徴を利用した薬物の徐放化に利用されている。第1節の結果よりHTは、CDの種類に応じて安定な状態をとることが起因していると推察された。よって、目的に応じてCDの種類を選択することで、HTを有効的に利用できる。HTとCD誘導体 (HP β CD、M β CD、TA β CD および HP γ CD)^{83, 84)}において包接複合体が形成可能となれば、HTの利用目的拡大になることが考えられる。

そこで、第2節では、それぞれ異なる特性を有するCD誘導体 (HP β CD、M β CD、TA β CD および HP γ CD) を用いてHTとの複合体形成の検討を行うこととした。HTとCD誘導体との分子間相互作用の形成およびHTの溶出挙動への影響を評価した。

2-1 HT/CD 誘導体の複合体比の検討

CD 誘導体として、HP β CD、M β CD、TA β CD および HP γ CD を用いて HT との複合体配合比の検討を行った。方法は、第 1 節同様、連続変化法 (job's plot) により検討を行った⁸⁵⁾。CDs 添加に伴う吸光度変化により得られたプロットを Fig.25-28 に示す。 β CD 誘導体 (HP β CD、M β CD および TA β CD) の添加により、HT の吸光度変化は HT/CD の比が 0.5 において最大値を示すことから、溶液中における HT/HP β CD、HT/M β CD および HT/TA β CD 複合体の組成比は 1/1 であると推察された。また、 γ CD 誘導体 (HP γ CD) の添加により、吸光度変化は HT/CD の比が 0.5 において最大値を示すことから、溶液中における HT/HP γ CD 複合体の組成比は 1/1 であると推察された。

これらの結果は、第 1 節で示した、 β CD および γ CD の結果と同様であった。よって、CD のヒドロキシ基に置換基がついても、包接能は CD の空洞径に依存すると考えられた。

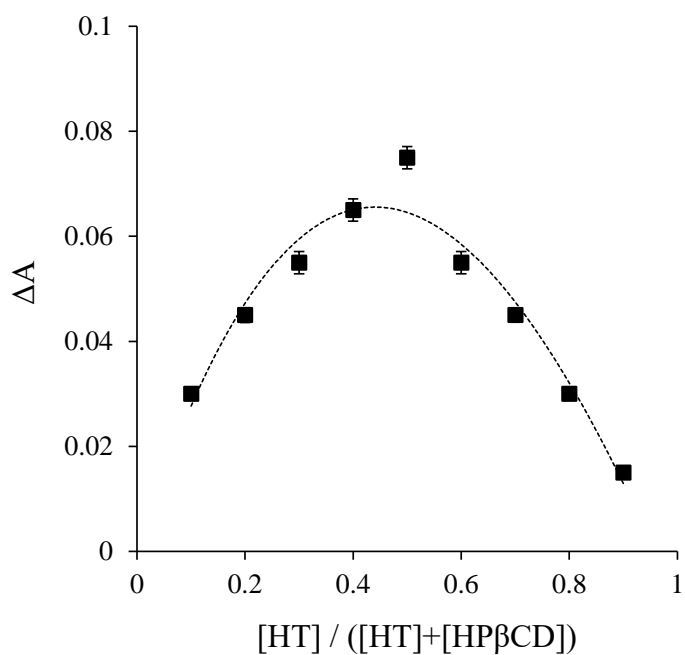


Fig. 25 Job's plot of the HT/HPβCD systems. Results were expressed as mean ± S.D. (n=3)

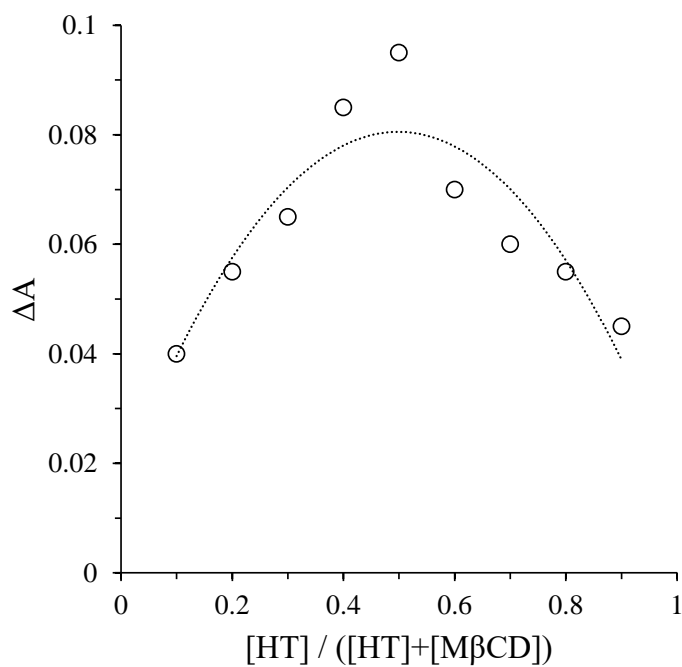


Fig. 26 Job's plot of the HT/MβCD systems. Results were expressed as mean ± S.D. (n=3)

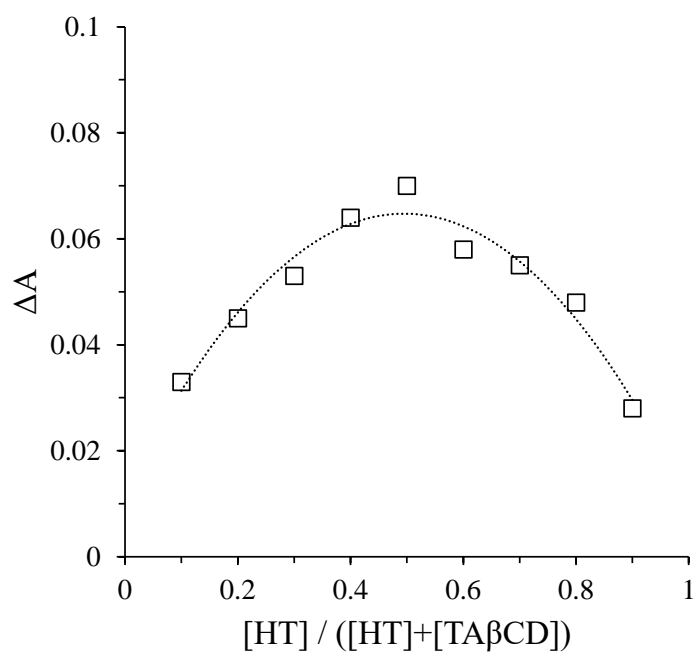


Fig. 27 Job's plot of the HT/TAβCD systems. Results were expressed as mean ± S.D. (n=3)

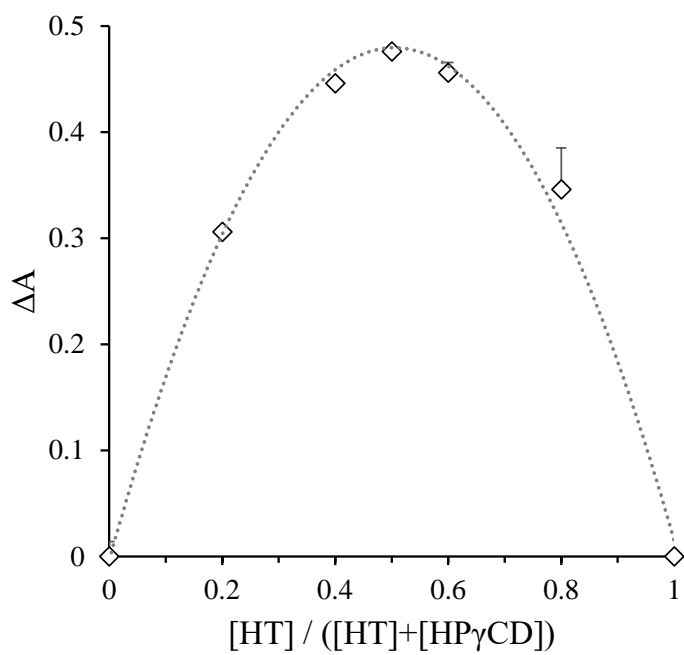


Fig. 28 Job's plot of the HT/HPγCD systems. Results were expressed as mean ± S.D. (n=3)

2-2 HT/CD 誘導体複合体の熱的性質の検討

HT と CD 誘導体 (HP β CD、M β CD、TA β CD および HP γ CD) との混合粉砕物における熱的挙動を検討するために、第 1 節同様に DSC 測定を行った (Fig.29)。

PM (HT/HP β CD=1/1)、PM (HT/M β CD=1/1)、PM (HT/TA β CD=1/1) および PM (HT/HP γ CD=1/1) において、50°C 付近に HT 結晶の融解に由来する吸熱ピークが観察された (Fig.29 g-j)。一方、GM (HT/HP β CD=1/1)、GM (HT/M β CD=1/1)、GM (HT/TA β CD=1/1) および GM (HT/HP γ CD=1/1) では HT 結晶の融解に由来する吸熱ピークは観察されなかった (Fig.29 k-n)。

熱的挙動の変化が確認されたことより、モル比 HT/CD 誘導体=1/1 において分子間相互作用している可能性が推察された。

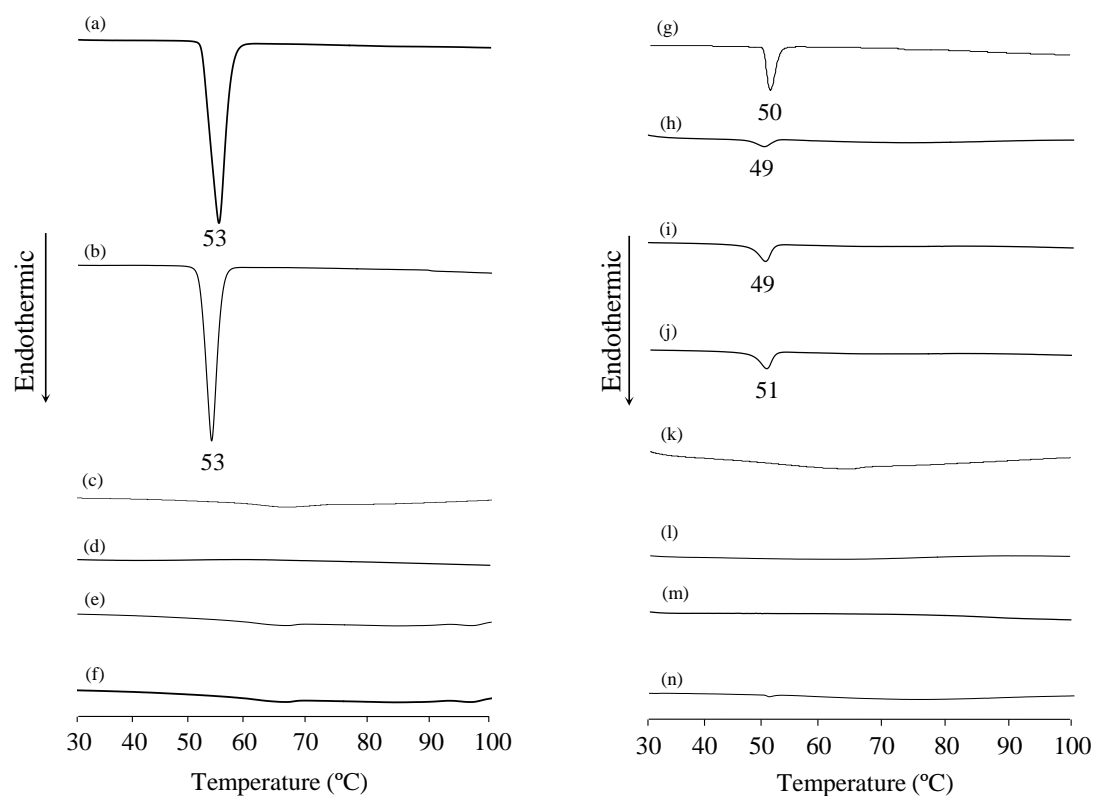


Fig. 29 DSC curves of HT/CDs systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) HP β CD, (d) M β CD, (e) TA β CD, (f) HP γ CD, (g) PM (HT/HP β CD=1/1), (h) PM (HT/M β CD=1/1), (i) PM (HT/TA β CD=1/1), (j) PM (HT/HP γ CD=1/1), (k) GM (HT/HP β CD=1/1), (l) GM (HT/M β CD=1/1), (m) GM (HT/TA β CD=1/1), (n) GM (HT/HP γ CD=1/1).

2-3 HT/CD 誘導体複合体における結晶状態の評価

HT/CDs 複合体における結晶状態を評価するために、PXRD 測定を行った。

HP β CD 単独は、特徴的な回折ピークは観察されず、ハローパターンを示した⁸⁶⁾ (Fig.30 c)。PM (HT/HP β CD=1/1) および GM (HT/HP β CD=2/1) では $2\theta=10.3^\circ$ 、 23.6° 付近に HT 結晶由来の回折ピークが観察された (Fig.30 d, e)。一方、GM (HT/HP β CD=1/1) においては、HT 結晶由来の回折ピークは観察されず、ハローパターンを示した (Fig.30 f)。M β CD 単独は、特徴的な回折ピークは観察されず、ハローパターンを示した⁸⁷⁾ (Fig.31 c)。PM (HT/HM β CD=1/1) および GM (HT/M β CD=2/1) では、 $2\theta=10.1^\circ$ 、 23.6° 付近に HT 結晶由来の回折ピークが観察された (Fig.31 d, e)。一方、GM (HT/M β CD=1/1) においては、HT 結晶由来の回折ピークは観察されず、ハローパターンを示した (Fig.31 f)。TA β CD 単独は、 $2\theta=6.9^\circ$ 、 9.3° に特徴的な回折ピーク⁸⁸⁾が観察された (Fig.32 c)。PM (HT/TA β CD=1/1) および GM (HT/TA β CD=1/1 および 2/1) では、 $2\theta=10.2^\circ$ 、 23.0° 付近に HT 結晶由来の回折ピーク、 $2\theta=6.9^\circ$ 、 9.3° に TA β CD 由来の回折ピークがそれぞれ観察された (Fig.32 d, e)。一方、GM (HT/TA β CD=1/1) においては、HT 結晶由来の回折ピークは観察されず、ハローパターンを示した (Fig.32 f)。HP γ CD 単独は、特徴的な回折ピークは観察されず、ハローパターンを示した (Fig.33 c)。PM (HT/HP γ CD=1/1) および GM (HT/HP γ CD=1/1) では $2\theta=10.1^\circ$ 、 23.6° 付近に HT 結晶由来の回折ピークが観察された (Fig.33 d, e)。GM (HT/HP γ CD=1/1) においては、HT 結晶由来の回折ピークおよび HP γ CD 由来の回折ピークは観察されず、ハローパターンを示した (Fig.33 f)。

混合粉碎法を用いたメカノケミカル効果により、薬物と CD 誘導体はハローパターンを示すことで、包接複合体形成を示すことが報告されている。よって、DSC および PXRD 測定の結果より、HT/CD 誘導体複合体形成が推察された。

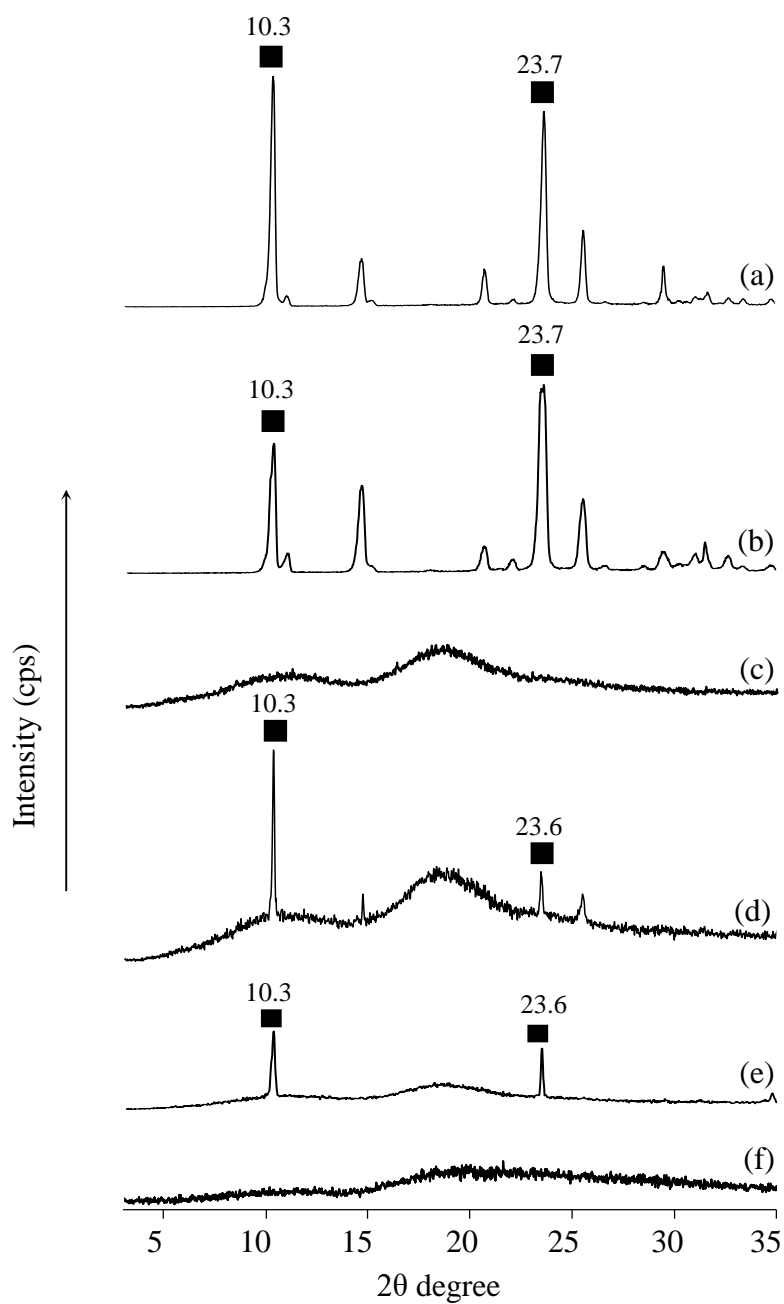


Fig. 30 PXRD patterns of HT/HP β CD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) HP β CD, (d) PM (HT/HP β CD=1/1),
 (e) GM (HT/HP β CD=2/1), (f) GM (HT/HP β CD=1/1).

■:HT

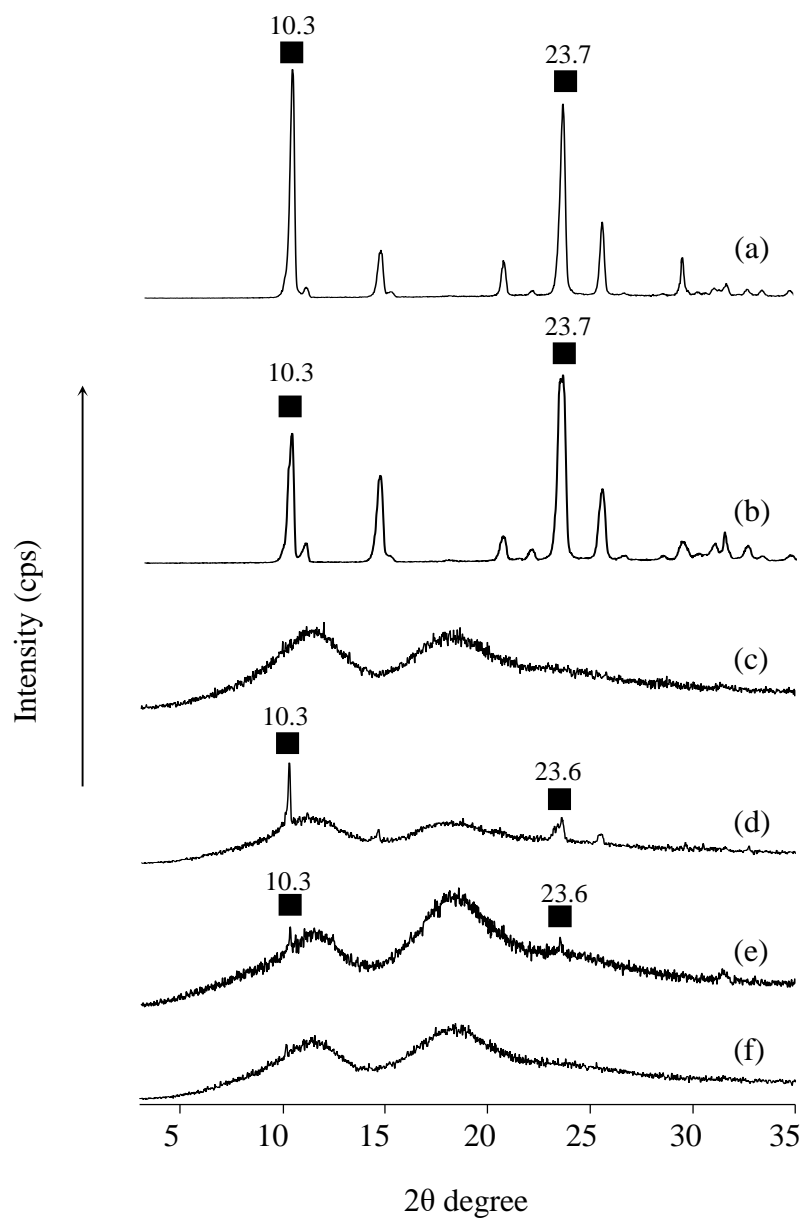


Fig. 31 PXRD patterns of HT/M β CD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) M β CD, (d) PM (HT/M β CD=1/1), (e) GM (HT/M β CD=2/1), (f) GM (HT/M β CD=1/1).

■:HT

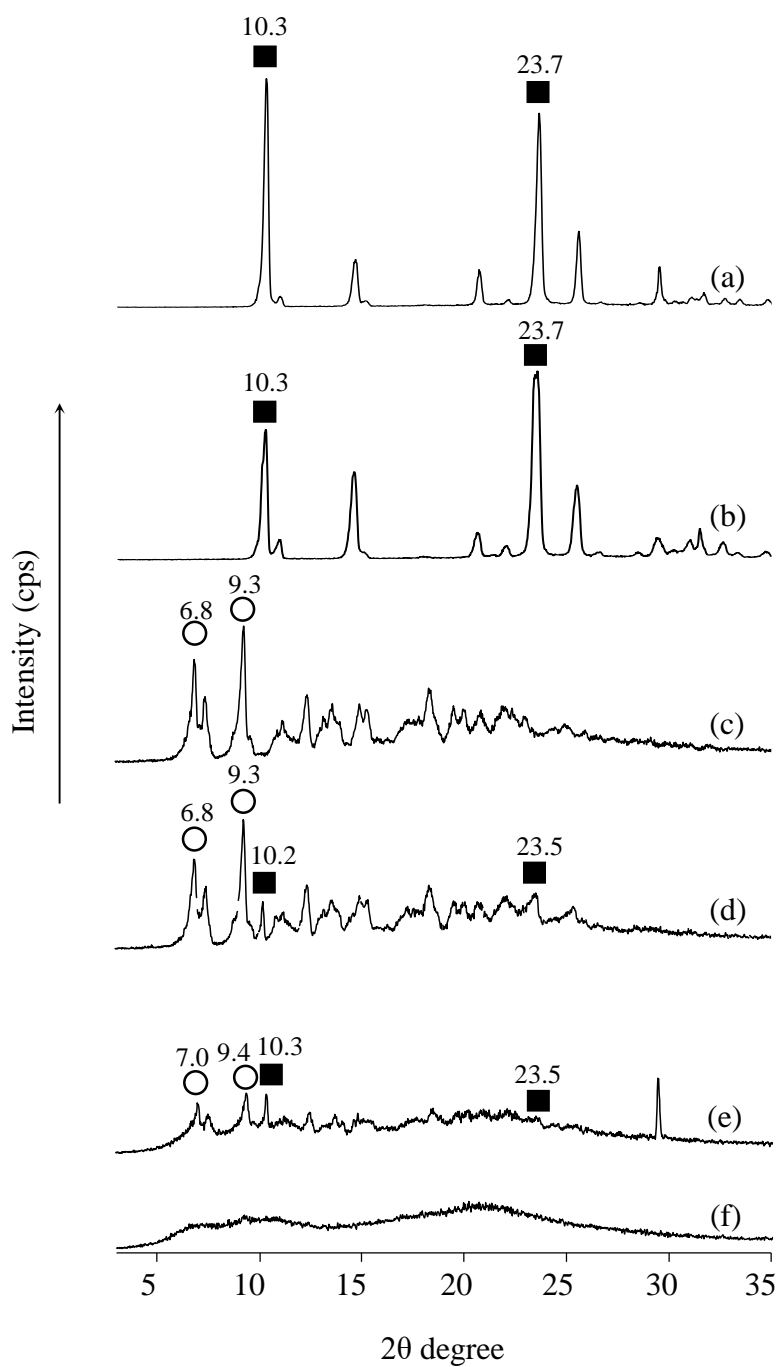


Fig. 32 PXRD patterns of HT/TA β CD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) TA β CD, (d) PM (HT/TA β CD=1/1), (e) GM (HT/TA β CD=2/1), (f) GM (HT/TA β CD=1/1).

■:HT, ○:TA β CD

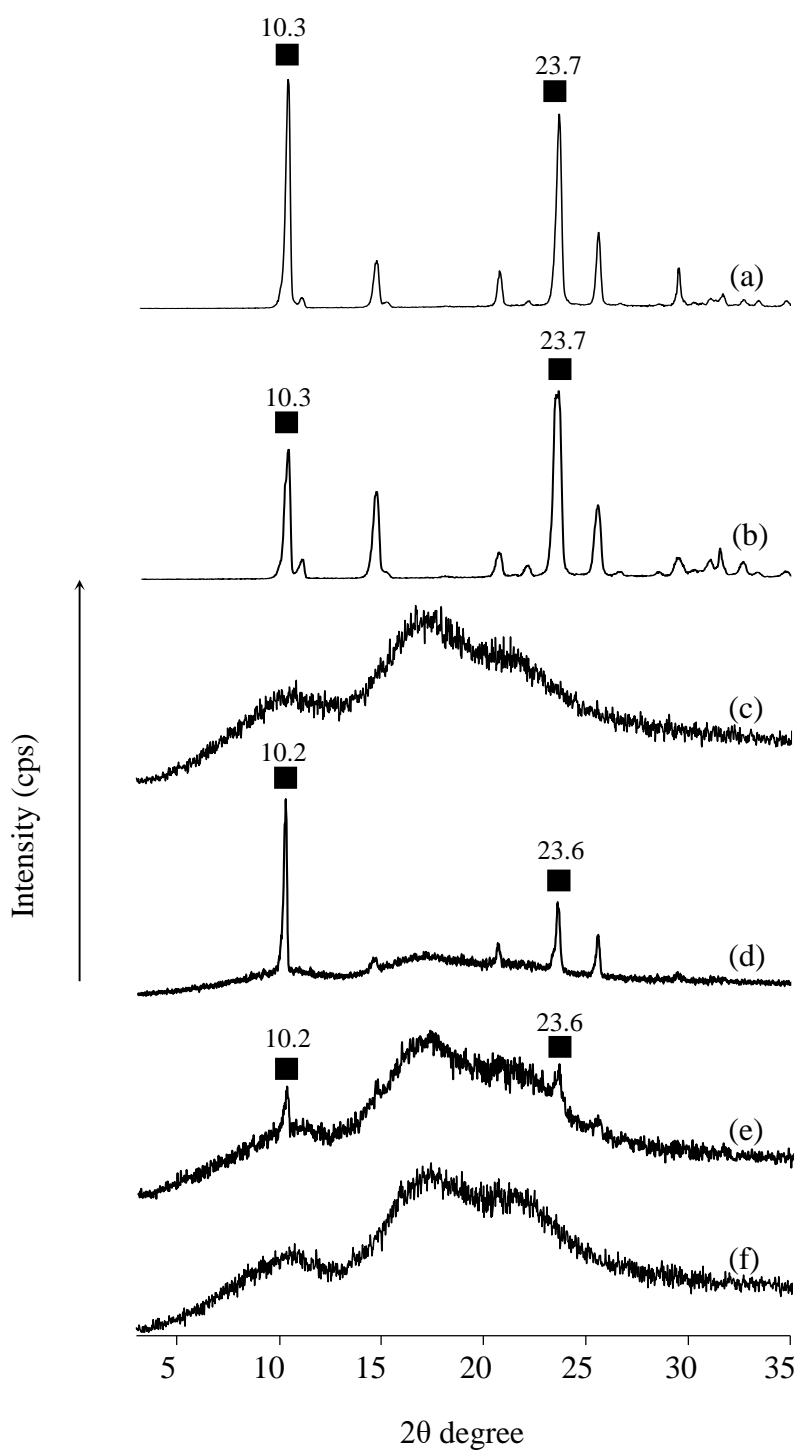


Fig. 33 PXR D patterns of HT/HP γ CD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) HP γ CD, (d) PM (HT/HP γ CD=1/1),
 (e) GM (HT/HP γ CD=2/1), (f) GM (HT/HP γ CD=1/1).

■:HT

2-4 固体状態における分子状態の検討

PXRD 測定および DSC 測定の結果より、モル比 HT/CDs=1/1 の 60 分間混合粉砕物において複合体形成が推察された。そこで、複合体中における分子状態を検討するため、FT-IR 測定を行った (Fig.34-37)。

FT-IR スペクトル測定の結果、HP β CD 単独では、1033 cm⁻¹ (C-O-C 伸縮振動)、1159 cm⁻¹ (C-O 伸縮振動)、1652 cm⁻¹ (H-O-H 変角振動)、2930 cm⁻¹ (-C-H 伸縮振動)、3418 cm⁻¹ を中心として 3800-3100 cm⁻¹ 間にヒドロキシ基(O-H 伸縮振動) 由来のブロードな吸収スペクトル⁸⁹⁾が確認された (Fig.34 c)。PM (HT/HP β CD=1/1) においても HT 分子構造中のカルボニル基およびヒドロキシ基に由来する吸収スペクトルが HT 結晶と同様に認められた (Fig.34 d)。しかしながら、GM (HT/HP β CD=1/1) では 1608 cm⁻¹ 付近に確認された HT のカルボニル基の吸収スペクトルが 1607 cm⁻¹ へ低波数側にシフトしていることが確認された。さらに、GM (HT/HP β CD=1/1) では、3200 cm⁻¹ に確認された HT のヒドロキシ基の吸収スペクトルの消失または高波数側へのシフトが確認された (Fig.34 e)。

M β CD 単独では、1043 cm⁻¹ (C-O-C 伸縮振動)、1158 cm⁻¹ (C-O 伸縮振動)、1653 cm⁻¹ (H-O-H 変角振動)、2928 cm⁻¹ (-C-H 伸縮振動)、3434 cm⁻¹ を中心として 3800-3100 cm⁻¹ 間にヒドロキシ基 (O-H 伸縮振動)由来のブロードな吸収スペクトル⁹⁰⁾が確認された (Fig.35 c)。PM (HT/M β CD=1/1) においても HT 分子構造中のカルボニル基およびヒドロキシ基に由来する吸収スペクトルが HT 結晶と同様に認められた (Fig.35 d)。しかしながら、GM (HT/M β CD=1/1) では 1608 cm⁻¹ 付近に確認された HT のカルボニル基の吸収スペクトルが 1611 cm⁻¹ へ高波数側にシフトしていることが確認された。さらに、GM (HT/M β CD=1/1) では、3200 cm⁻¹ に確認された HT のヒドロキシ基の吸収スペクトルの消失または高波数側へのシフトが確認された (Fig.35 e)。

TA β CD 単独では、1043 cm⁻¹ (C-O-C 伸縮振動)、1236 cm⁻¹ (C-O 伸縮振動)、1746

cm^{-1} (C=O 伸縮振動)、 2964 cm^{-1} (-C-H 伸縮振動) にそれぞれ吸収スペクトル⁹¹⁾が確認された (Fig.36 c)。また、TA β CD は、-OCOCH₃基で置き換えられた 1 級または 2 級 OH しか存在しないため、他の CD で観察された 3400 cm^{-1} 付近のヒドロキシ基由来のブロードな吸収スペクトルは確認されなかった。PM (HT/TA β CD=1/1) においても HT 分子構造中のカルボニル基およびヒドロキシ基に由来する吸収スペクトルが HT 結晶と同様に認められた (Fig.36 d)。しかしながら、GM (HT/TA β CD=1/1) では、 3200 cm^{-1} に確認された HT のヒドロキシ基の吸収スペクトルの消失が確認された (Fig.36 e)。

HP γ CD 単独では、 1026 cm^{-1} (C-O-C 伸縮振動)、 1158 cm^{-1} (C-O 伸縮振動)、 1653 cm^{-1} (H-O-H 変角振動)、 2928 cm^{-1} (-C-H 伸縮振動)、 3392 cm^{-1} を中心として $3800\text{--}3100 \text{ cm}^{-1}$ 間にヒドロキシ基 (O-H 伸縮振動) 由来のブロードな吸収スペクトル⁹²⁾が確認された (Fig.37 c)。PM (HT/HP γ CD=1/1) においても HT 分子構造中のカルボニル基およびヒドロキシ基に由来する吸収スペクトルが HT 結晶と同様に認められた (Fig.37 d)。しかしながら、GM (HT/HP γ CD=1/1) では 1608 cm^{-1} 付近に確認された HT のカルボニル基の吸収スペクトルが 1616 cm^{-1} へ高波数側にシフトしていることが確認された。さらに、GM (HT/HP γ CD=1/1) では、 3200 cm^{-1} に確認された HT のヒドロキシ基の吸収スペクトルの消失または低波数側へのシフトが確認された (Fig.37 e)。

これらのことから、CD 空洞内におけるヒドロキシ基と HT のヒドロキシ基との間に分子間相互作用が推察された。固体状態において HT および各 CD の吸収スペクトルのシフトが確認されたことより、複合体形成により HT および各 CD それぞれの分子運動に変化が生じた⁹³⁾ものと考えられた。

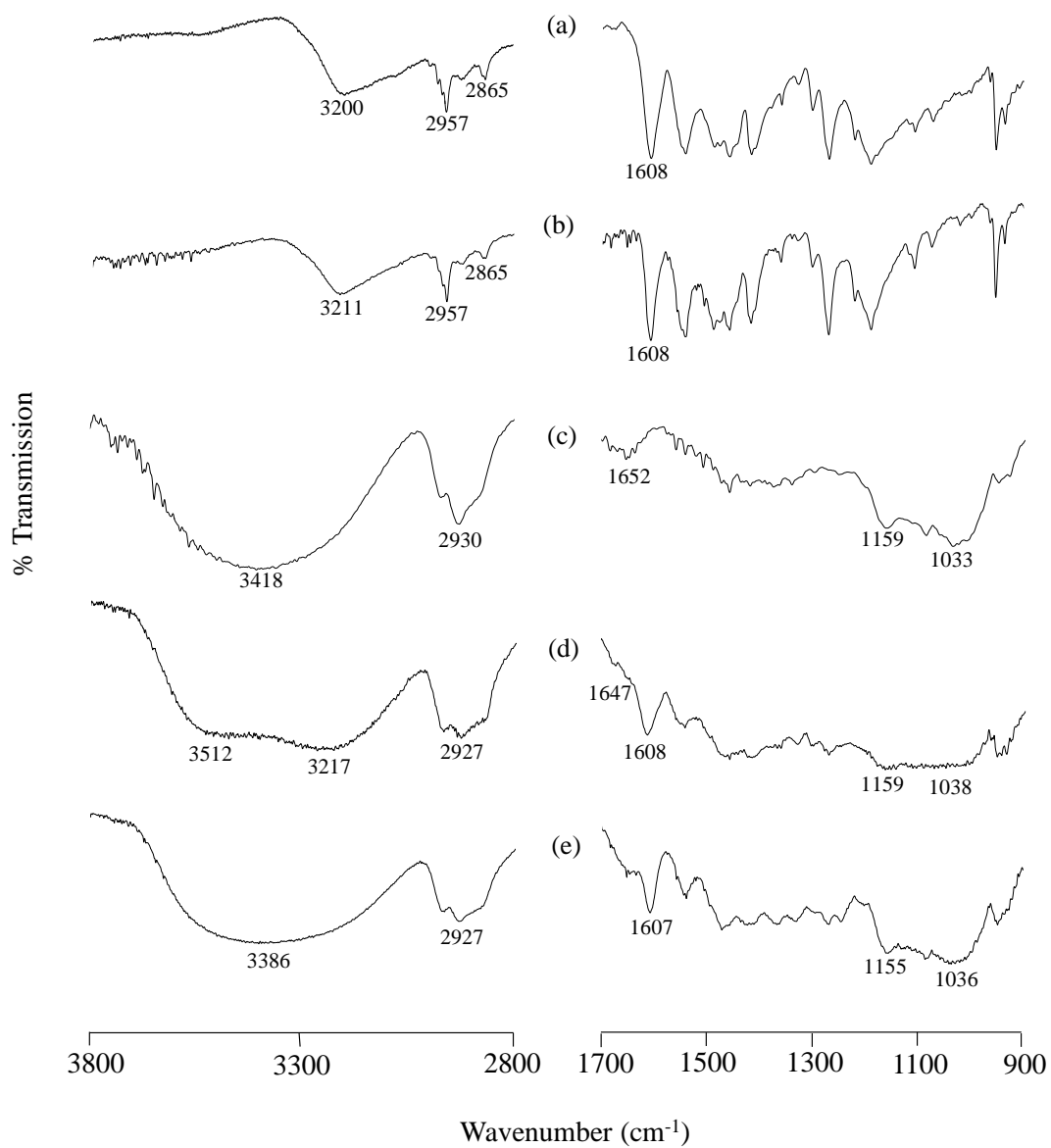


Fig. 34 FT-IR spectra of HT/HPβCD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) HPβCD, (d) PM (HT/HPβCD=1/1),
 (e) GM (HT/HPβCD=1/1).

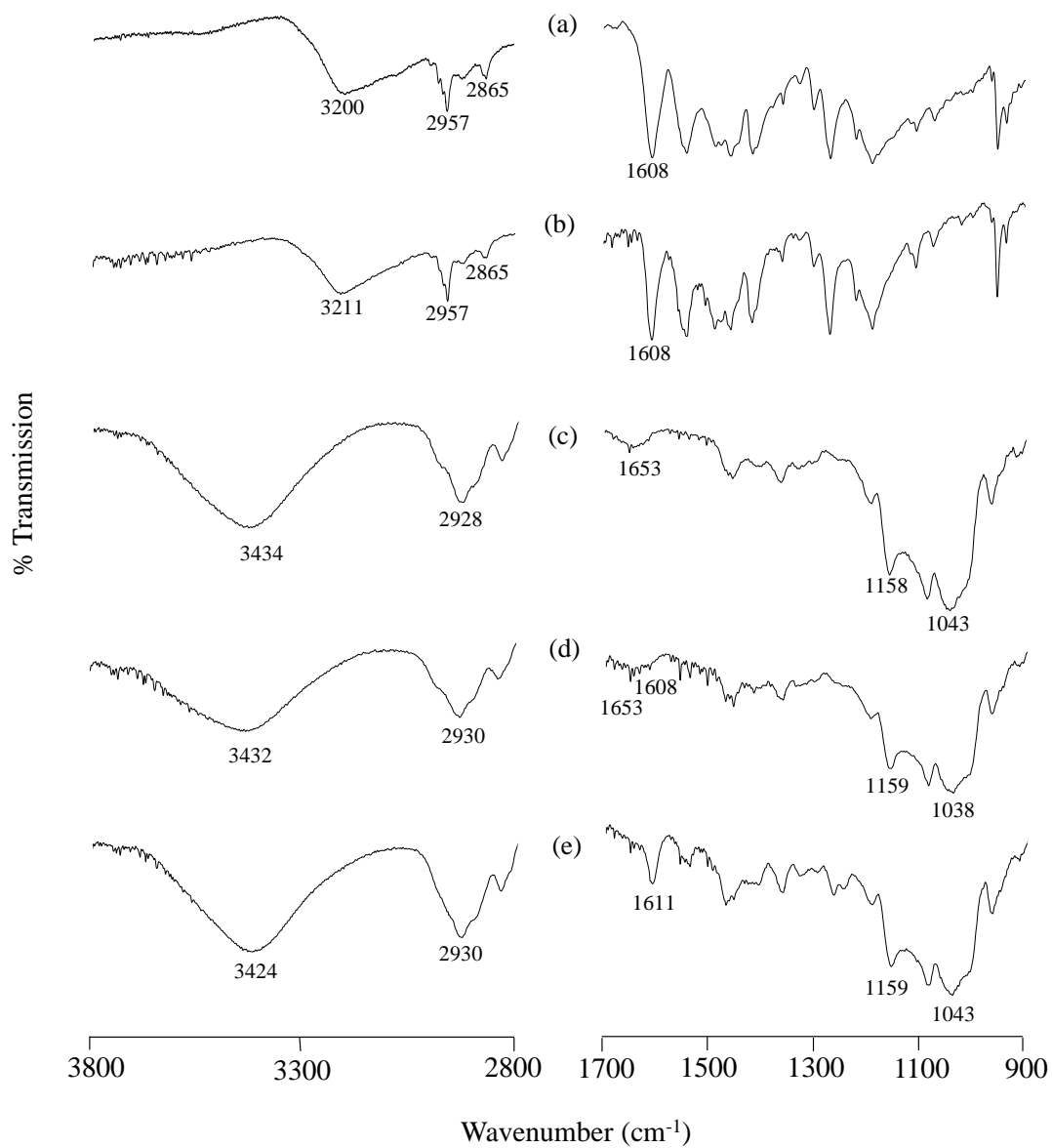


Fig. 35 FT-IR spectra of HT/MβCD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) MβCD, (d) PM (HT/MβCD=1/1), (e) GM (HT/MβCD=1/1).

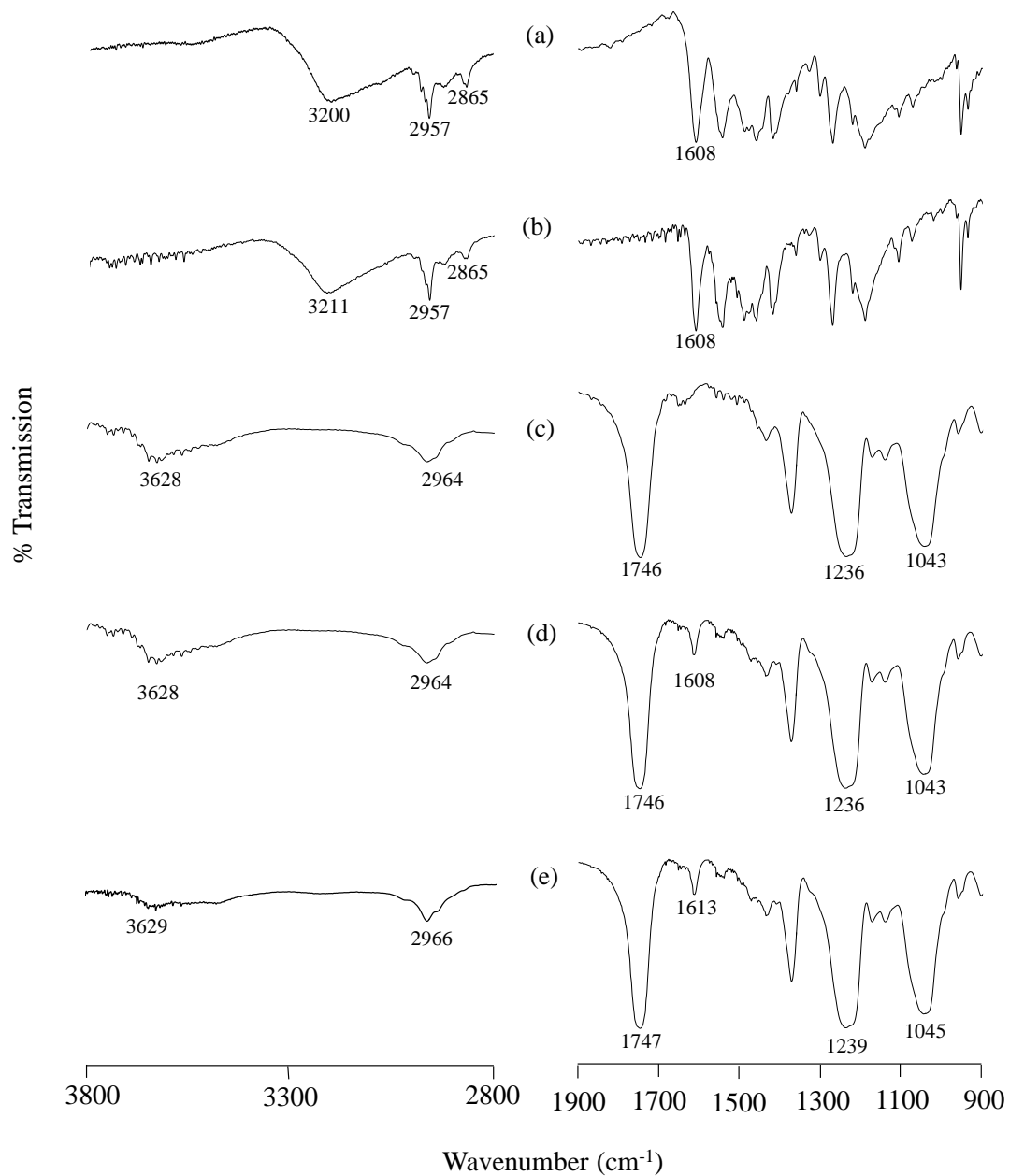


Fig. 36 FT-IR spectra of HT/TAβCD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) TAβCD, (d) PM (HT/TAβCD=1/1),
 (e) GM (HT/TAβCD=1/1).

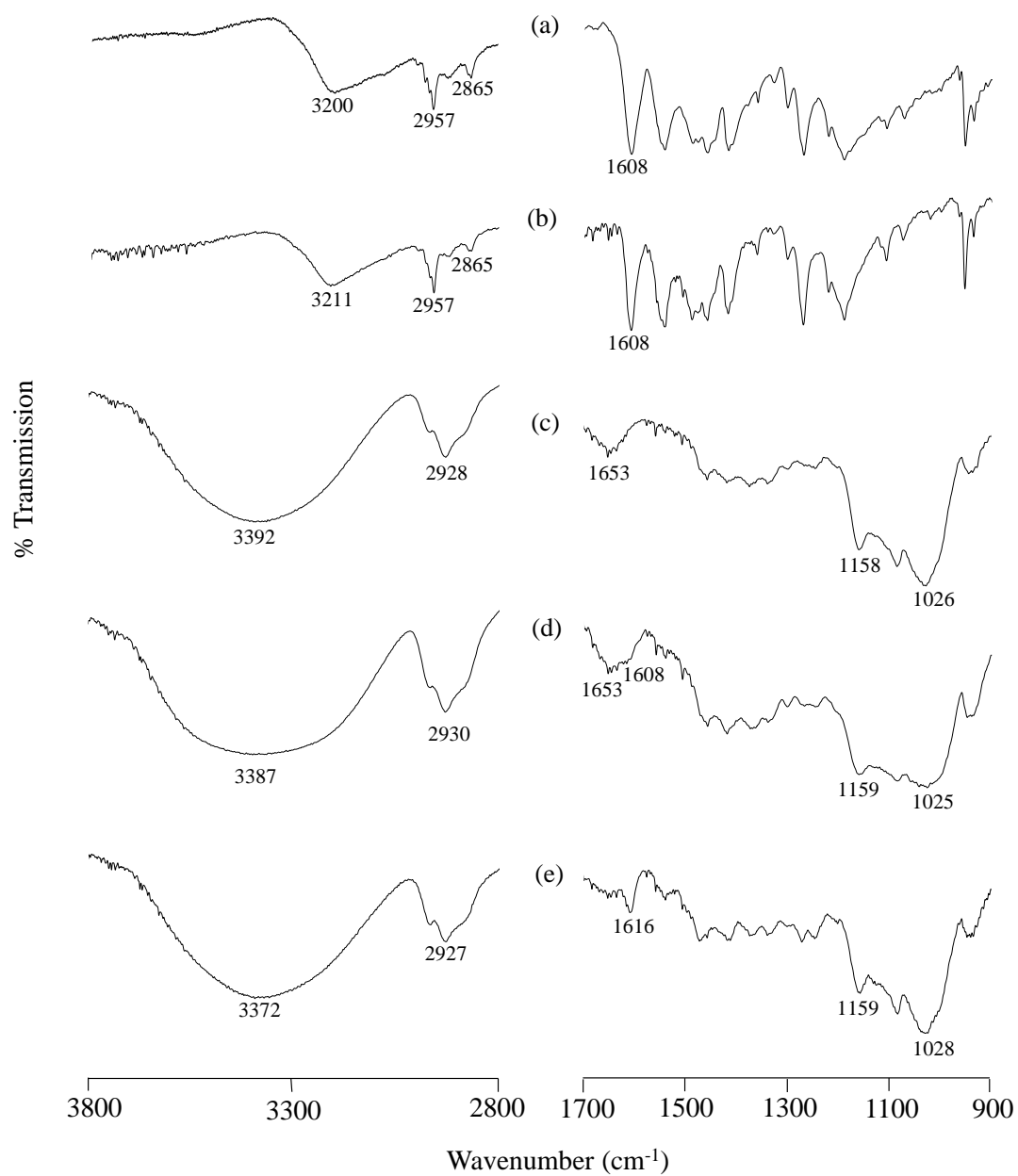


Fig. 37 FT-IR spectra of HT/HP γ CD systems.

(a) HT intact, (b) HT ground, (c) HP γ CD, (d) PM (HT/HP γ CD=1/1),
(e) GM (HT/HP γ CD=1/1).

2-5 HT/CD 誘導体複合体の溶出性評価

固体状態の物性評価により、GM (HT/HP β CD=1/1)、GM (HT/M β CD=1/1)、GM (HT/TA β CD=1/1) および GM (HT/HP γ CD=1/1) において包接複合体形成が示唆された。そこで、分子間相互作用形成による HT の溶解性を確認するために、HT 単独、HT 単独粉砕物、PM (HT/HP β CD=1/1)、PM (HT/M β CD=1/1)、PM (HT/TA β CD=1/1)、PM (HT/HP γ CD=1/1)、GM (HT/HP β CD=1/1)、GM (HT/M β CD=1/1)、GM (HT/TA β CD=1/1) および GM (HT/HP γ CD=1/1) について溶出試験を行った (Fig.38)。

溶出試験の結果、PM (HT/HP β CD=1/1)、PM (HT/M β CD=1/1)、PM (HT/TA β CD=1/1)、PM (HT/HP γ CD=1/1) 中において、HT は結晶として存在しているため、分散性およびぬれ性が悪く、緩やかな溶出挙動を示した。一方、GM (HT/HP β CD=1/1) および GM (HT/M β CD=1/1) は、5 分値において 75% および 97% の溶出率を示し、立ち上がりが GM (HT/ β CD=1/1) と比較しても高く、初期の段階でほぼ HT が溶出することが確認された。また、GM (HT/TA β CD=1/1) では、5 分値において HT 単独同様の約 1.8% の溶出率を示し、立ち上がりが緩やかであり、時間経過に伴い徐々に溶出するプロファイルが得られた。GM (HT/HP γ CD=1/1) では、5 分値において 91% の溶出率を示し、立ち上がりが GM (HT/ γ CD=1/1) と比較してもわずかに高く、初期の段階でほぼ HT が溶出することが確認された。以上の結果から、HT 結晶と比較し GM (HT/HP β CD=1/1)、GM (HT/M β CD=1/1)、GM (HT/TA β CD=1/1) および GM (HT/HP γ CD=1/1) において HT の溶出性の向上が認められた。このことは、混合粉砕することにより分散性が向上したことが寄与していると推察した。また、PXRD 測定の結果より、GM (HT/HP β CD=1/1)、GM (HT/M β CD=1/1)、GM (HT/TA β CD=1/1) および GM (HT/HP γ CD=1/1) においては、ハローパターンを示したことから包接複合体形成による非晶質化が確認されている (Fig. 30-33)。包接複合体形成により、ゲスト分子が非晶質化することで溶解性が向上するとの報告があり、HT と CD の包接複合体

形成による HT の非晶質化が溶出性に反映したと推察した。また、CD 誘導体を用いた複合体において HT の溶出率が高かった理由として、CD 誘導体それぞれの分子構造の違いが、異なる HT の分子状態での複合体形成に影響し、それぞれの複合体からの HT の溶出性に起因した可能性が考えられた^{94, 95)}。

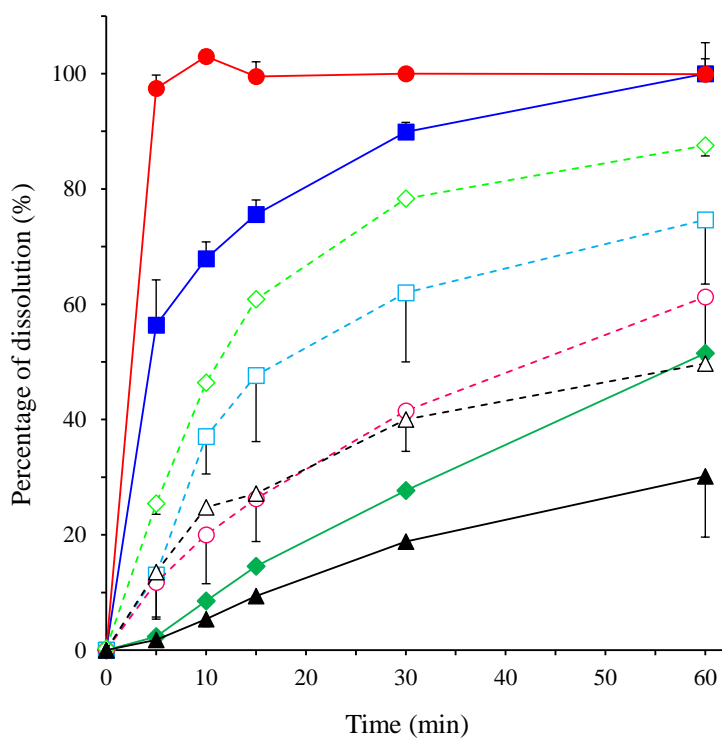


Fig. 38-1 Dissolution profiles of HT/CDs systems.

▲:HT intact, △:HT ground, □:PM (HT/βCD=1/1), ○:PM (HT/HPβCD=1/1),
 ○:PM (HT/MβCD=1/1), ◇:PM (HT/TAβCD=1/1), ■:GM (HT/βCD=1/1), ●:GM
 (HT/HPβCD=1/1), ●:GM (HT/MβCD=1/1), ◆:GM (HT/TAβCD=1/1).

Results were expressed as mean ± S.D. (n=3)

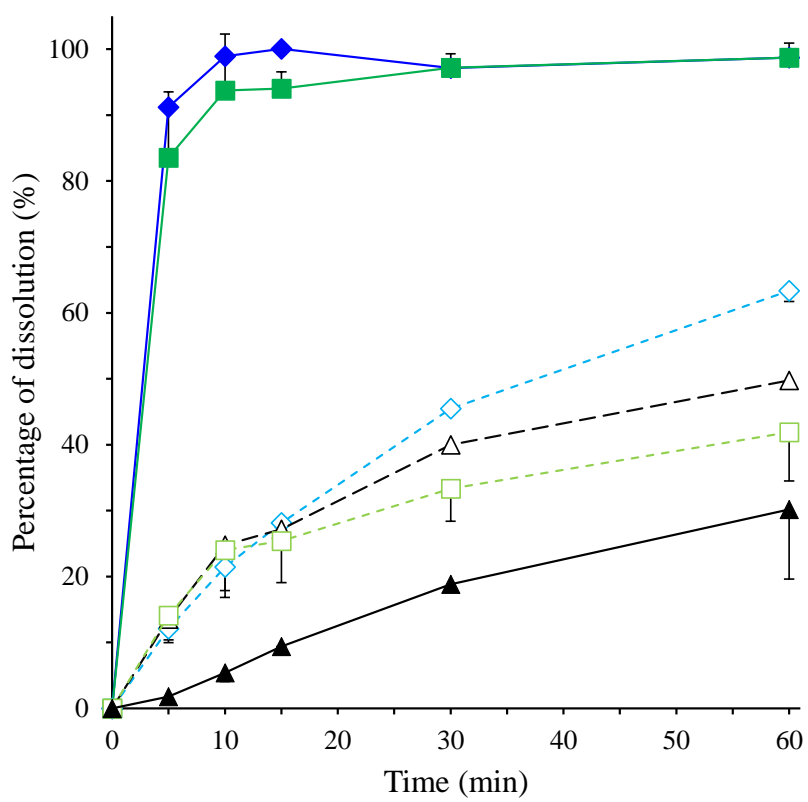


Fig. 38-2 Dissolution profiles of HT/CDs systems.

▲:HT intact, △:HT ground, □:PM (HT/γCD=1/1), ◇:PM (HT/HPγCD=1/1),
 ■:GM (HT/γCD=1/1), ◆:GM (HT/HPγCD=1/1).

Results were expressed as mean \pm S.D. (n=3)

2-6 溶液状態における分子間相互作用の検討

溶出試験の結果より、GM において HT 結晶単独と比較し溶出性の向上が確認され、溶液状態における HT とそれぞれの CD 誘導体間での分子間相互作用が溶出性に影響を与えた可能性が考えられた。ここまで固体状態での HT の分子状態の特徴づけは FT-IR 測定によって行ったが、溶液状態における HT と CD の分子状態の特徴づけが必要である。そこで、水溶液中における分子状態の評価を行うために ^1H - ^1H 2D-NMR 測定を行った⁹⁶⁻⁹⁹⁾。

GM (HT/HP β CD=1/1) において、HT の七員環のプロトンに由来する H-A ピークと HP β CD の H-5 および H-6 ピーク間、HT のイソプロピル基のプロトンに由来する H-F ピークと HP β CD の H-5 および H-6 ピーク間でクロスピークが観察された (Fig.39)。よって、GM (HT/HP β CD=1/1) では、HT の七員環部分より CD 空洞内に入っており狭い縁付近に位置し、狭い縁に HT のイソプロピル基が位置しているものと推察された。GM (HT/M β CD=1/1) では、HT の七員環に由来する H-A および H-B ピークと M β CD の H-3、H-5 および H-6 ピーク間、HT のイソプロピル基に由来する H-F ピークと M β CD の H-3、H-5 および H-6 ピーク間でクロスピークが観察された (Fig.40)。よって、GM (HT/M β CD=1/1) では、HT のイソプロピル基部分より CD 空洞内に入っており狭い縁付近に位置し、広い縁に HT の七員環部分が位置しているものと推察された。GM (HT/TA β CD=1/1) では、HT の七員環のプロトンに由来する H-A ピークと TA β CD の H-3 および H-5 ピーク間、HT のイソプロピル基のプロトンに由来する H-F ピークと TA β CD の H-5 ピーク間でクロスピークが観察された (Fig.41)。よって、GM (HT/TA β CD=1/1) では HT の七員環部分より CD 空洞内に入っており狭い縁付近に位置し、広い縁に HT のイソプロピル基が位置しているものと推察された。GM (HT/HP γ CD=1/1) において、HT の七員環のプロトンに由来する H-A、H-B、H-C および H-D ピークと HP γ CD の H-3、H-5 および H-6 ピーク間、HT のイソプロピル基のプ

ロトンに由来する H-F ピークと HP γ CD の H-6 ピーク間でクロスピークが観察された (Fig.42)。よって、GM (HT/HP γ CD=1/1) では HT の七員環部分より CD 空洞内に入りており広い縁付近に位置し、狭い縁に HT のイソプロピル基が位置しているものと推察された。

以上の結果から、HT/HP β CD、HT/M β CD、HT/TA β CD および HT/HP γ CD では異なる包接様式¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾であることが示唆された。HT/HP β CD および HT/TA β CD では、CD の置換基による立体障害により、CD 空洞の縁に HT が留まるかたちで複合体を形成していることが推察された。一方、HT/M β CD では、置換基がメチル基とかさ高くないため、CD 空洞内深部に HT が位置していることが推察された。HT/HP γ CD では、 γ CD に置換基であるヒドロキシプロピル基が付いているため、構造的にはかさ高いが、 γ CD であるため、CD 空洞径が大きいことから HT を空洞内深部に包接していると推察された。よって、HT は、CD の種類に応じて異なる複合体形式をとることが確認された。これらの包接様式の違いが、HT の溶出挙動に影響を与えたものと推察された。

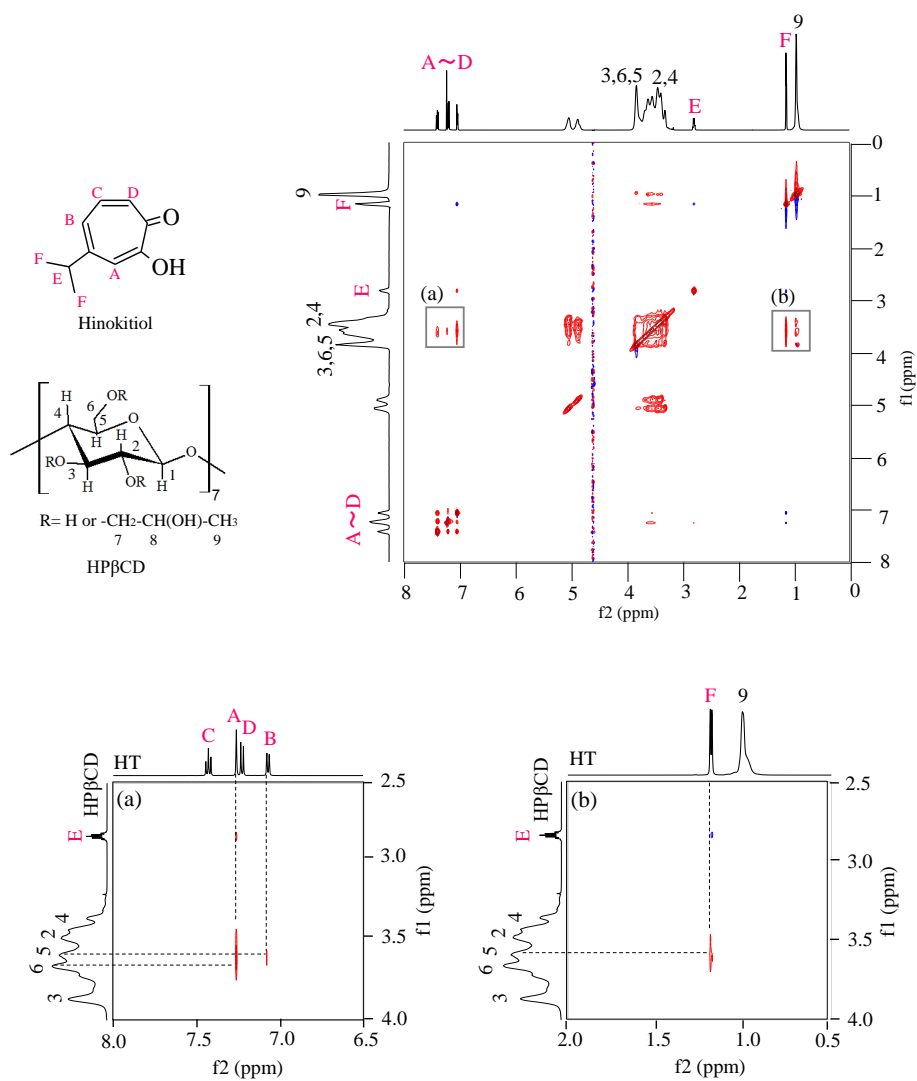


Fig. 39 ¹H-¹H NOESY NMR spectrum of HT/HPβCD.
 (a) GM (molar ratio of HT/HPβCD = 1/1) X is 6.5-8.0 and the Y axis is 2.5-4.0,
 (b) GM (molar ratio of HT/HPβCD = 1/1) X is 0.5-2.0 and the Y axis is 2.5-4.0.

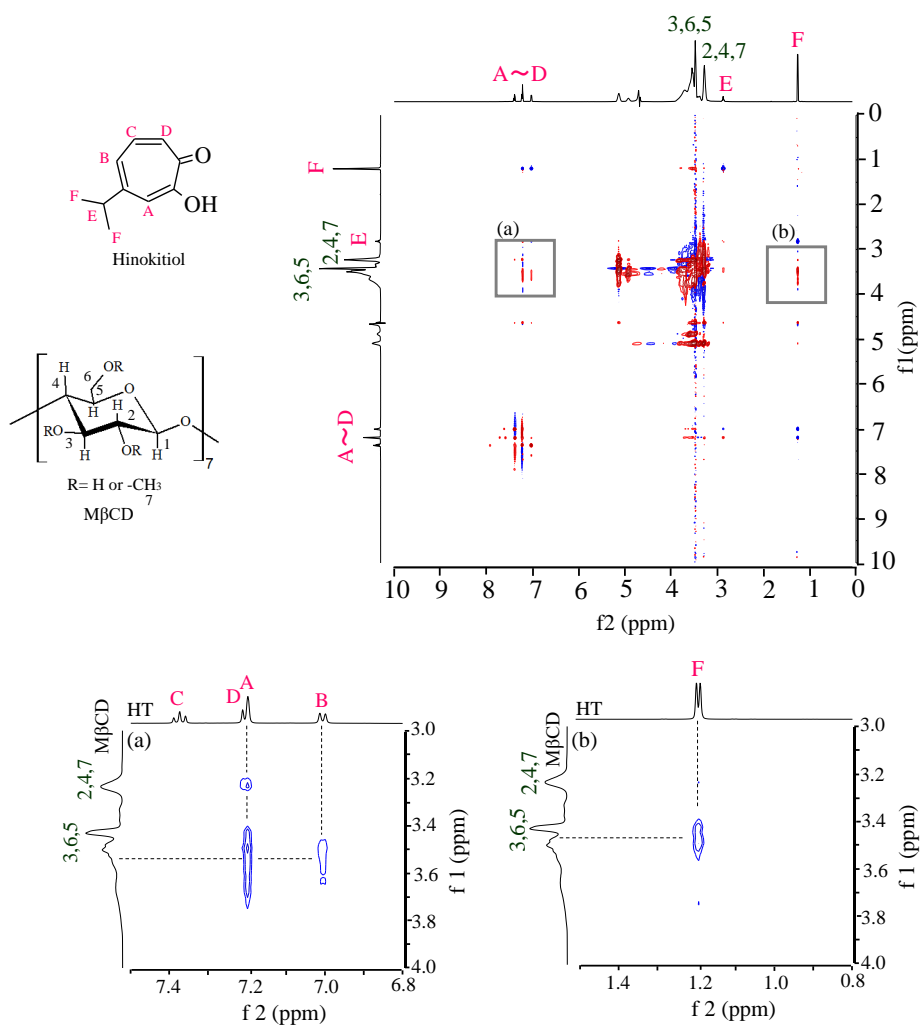


Fig. 40 ¹H-¹H NOESY NMR spectrum of HT/MβCD.
 (a) GM (molar ratio of HT/MβCD = 1/1) X is 6.8-7.5 and the Y axis is 3.0-4.0,
 (b) GM (molar ratio of HT/MβCD = 1/1) X is 0.8-1.5 and the Y axis is 3.0-4.0.

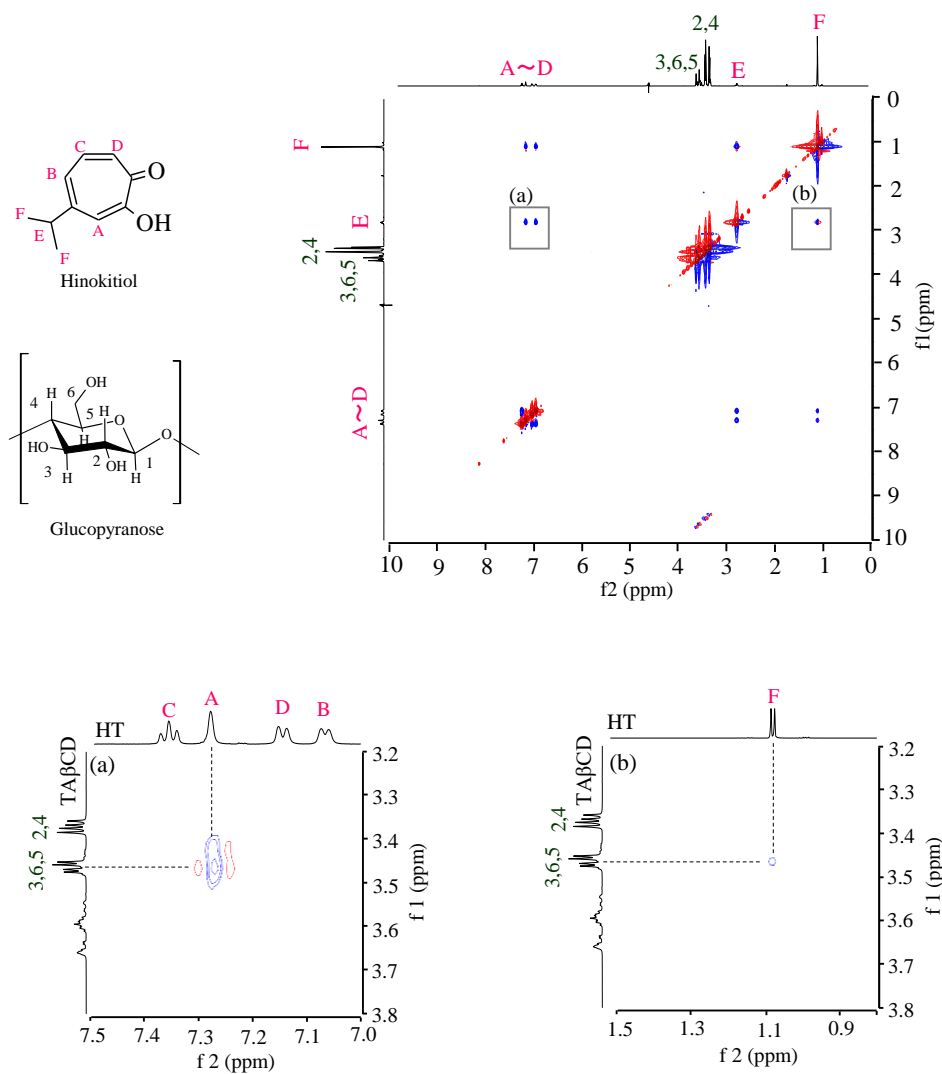


Fig. 41 ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum of HT/TA β CD.

(a) GM (molar ratio of HT/TA β CD = 1/1) X is 7.0-7.5 and the Y axis is 3.2-3.8,
 (b) GM (molar ratio of HT/TA β CD = 1/1) X is 0.8-1.5 and the Y axis is 3.2-3.8.

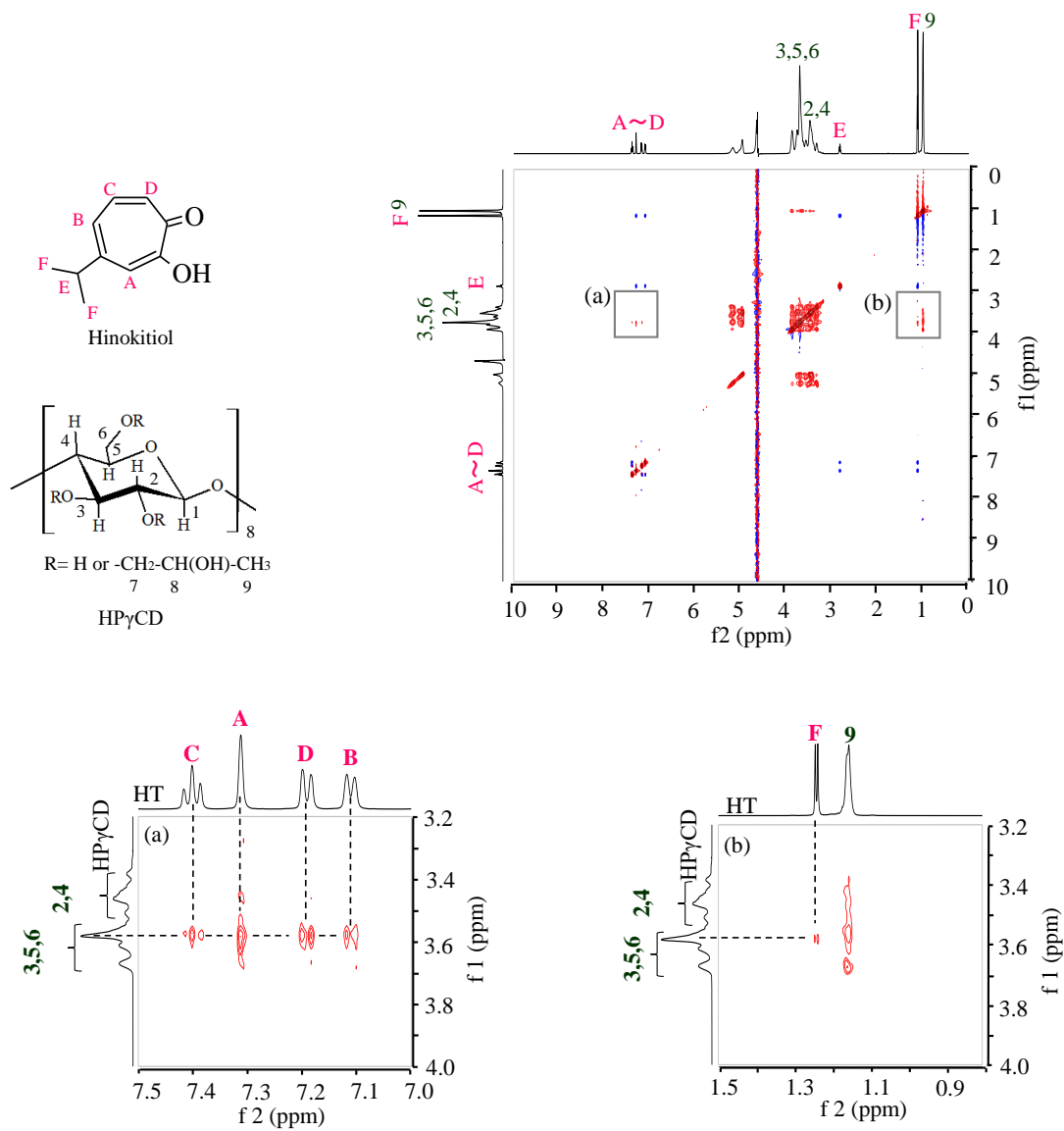


Fig. 42 ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum of HT/HP γ CD.

(a) GM (molar ratio of HT/HP γ CD = 1/1) X is 7.0-7.5 and the Y axis is 3.2-4.0,
 (b) GM (molar ratio of HT/HP γ CD = 1/1) X is 0.8-1.5 and the Y axis is 3.2-4.0.

第2節 小括

混合粉碎法による HT/HP β CD、HT/M β CD、HT/TA β CD および HT/HP γ CD 包接複合体形成が明らかとなり、包接複合体のモル比は HT/CDs=1/1 であった。2D ^1H - ^1H NMR 測定の結果に基づき各複合体の包接様式を推測したところ、CD の種類に応じて異なる複合体を形成していることが確認された。この結果は、CD 誘導体ごとの置換基の違い (ヒドロキシプロピル基、メチル基およびアセチル基) により HT との親和性が異なることによるものである。混合粉碎物における HT の溶出挙動の違いが確認されたメカニズムとして、CD の違いが形成される包接様式に反映されたことが明らかとなった。よって、利用目的に応じて使用する CD を選択することで、HT の放出タイミングをコントロールすることが可能となり、今後の HT の利用拡大に繋がるであろう。また、CD 誘導体はそのものに生理活性を示すことが知られており、HT と複合体を形成することで活性の相加・相乗効果を期待できる可能性がある。

第3節 混合粉砕法と共沈法による TPN と γ CD 複合体形成の検討

第3節 序

HT の基本構造であるトロポロン (TPN) は、平面 7 員環構造を持つ非ベンゼン系芳香族化合物の一種である。TPN は、結晶状態において分子内および分子間水素結合、ケト-エノール互変異性を示し、それらに起因した興味深い性質を示すことが知られている (Fig. 43, 44)¹⁰³。また、トロポロン骨格は多種の化合物への誘導が可能であり、今後医薬品分野での新たなファーマコフォアとして幅広い構造展開が可能である¹⁰⁴。

これまでに Higashi らは、サリチル酸と γ CD を用いた場合、 γ CD の空洞内だけでなく γ CD 同士で形成される外側の分子空間にサリチル酸が封入されることを報告しており、特異的な包接様式を利用した新たな医薬品への応用が期待されている¹⁰⁵。CD 同士で形成される分子空間へのゲスト分子の封入によって生じる、新たな包接複合体形成メカニズムを解明することは、今後の製品開発において有用である。

包接複合体の調製法には、溶媒を用いる方法もしくは固体状態で調製する方法など多くの調製法が知られている。そして、同じ CD を用いた場合でも調製法の違いにより、異なる包接構造を形成するとの報告がある。例えば、抗リウマチ薬であるアクタリットの場合、混合粉砕法と凍結乾燥法とでは、その調製法により異なるモル比の包接化合物が得られ、包接構造が異なることが報告されている¹⁰⁶。そこで、異なる調製法として混合粉砕法と共沈法を選択し、TPN/ γ CD 包接複合体形成メカニズムの違いについて評価を行った。さらに、 γ CD 同士で形成される分子空間へのゲスト分子の封入に着目し、TPN の γ CD 同士で形成される空間を利用した複合体形成について検討を行った。

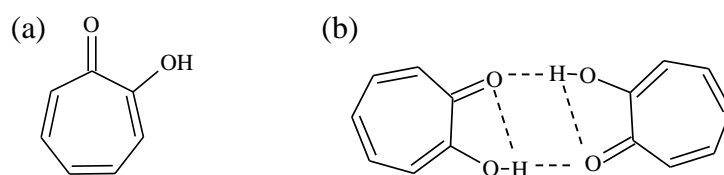


Fig. 43 TPN of structures.

(a) TPN, (b) TPN dimer (Intramolecular-intermolecular hydrogen bonds).

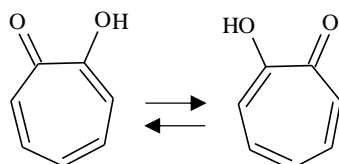


Fig. 44 TPN of keto-enol tautomerism structure.

3-1 TPN/ γ CD 複合体の熱的性質の検討

TPN/ γ CD の混合粉砕物の熱的安定性を検討するために DSC 測定を行った (Fig.45)。TPN および TPN 単独粉砕物において、TPN の融点由来の吸熱ピークが 57°C 付近に確認された (Fig.45 a, b)。PM (TPN/ γ CD=2/1)、PM (TPN/ γ CD=4/1)、および GM (TPN/ γ CD=5/1) においても、47-50°C 付近に TPN の融解に由来する吸熱ピークが観察された (Fig.45 e-f, k)。一方、GM (TPN/ γ CD=1/1)、GM (TPN/ γ CD=2/1)、GM (TPN/ γ CD=3/1)、GM (TPN/ γ CD=4/1) および CP では TPN の融解に由来する吸熱ピークは観察されなかった (Fig.45 g-j, l)。

熱的挙動の変化は、固体分散体中のゲストと CD の包接複合体または異なる特性を有する包接複合体の形成を示しているとの報告がある。混合粉砕物および共沈物における TPN の融点由来の吸熱ピークの低温シフトや熱量の減少¹⁰⁷⁾などは、粉砕による機械的なエネルギーが加わることで働くメカノケミカル効果が寄与していると推察された。

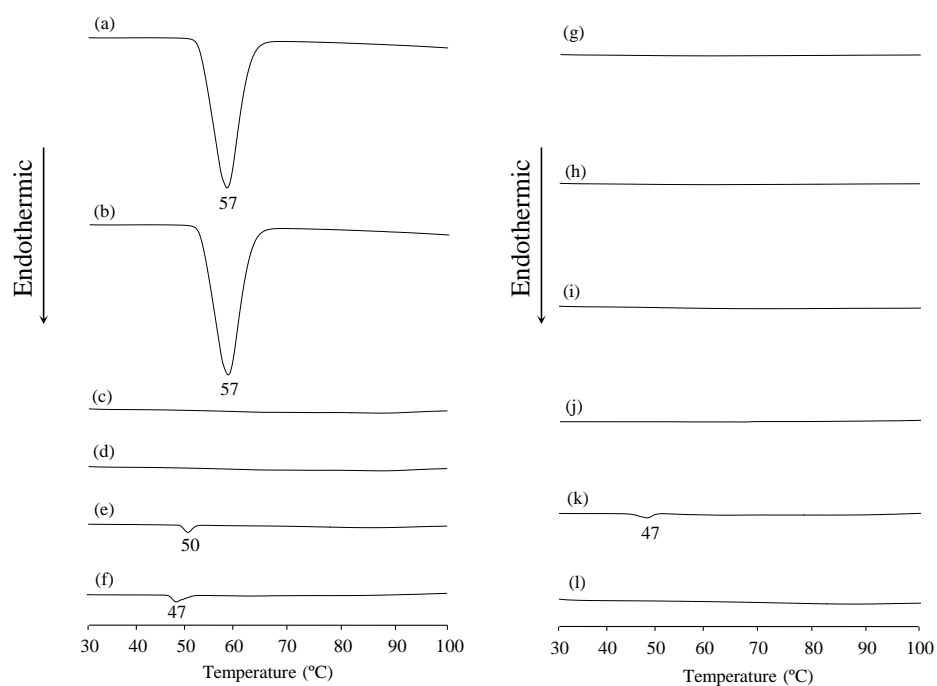


Fig. 45 DSC curves of TPN/ γ CD systems.

(a) TPN intact, (b) TPN ground, (c) γ CD, (d) γ CD ground, (e) PM (TPN/ γ CD=2/1), (f) PM (TPN/ γ CD=4/1), (g) GM (TPN/ γ CD=1/1), (h) GM (TPN/ γ CD=2/1), (i) GM (TPN/ γ CD=3/1), (j) GM (TPN/ γ CD=4/1), (k) GM (TPN/ γ CD=5/1), (l) CP (TPN/ γ CD).

3-2 TPN/ γ CD 複合体における結晶状態の評価

混合粉砕法における TPN/ γ CD の結晶状態を検討するために、粉末 X 線回折 (PXRD) 測定を行った。

TPN 結晶および TPN 単独粉砕物では、TPN の特徴的なピークが $2\theta=14.4^\circ$ 、 25.3° に観察された (Fig.46 a, b)。 γ CD 単独では、 $2\theta=14.4^\circ$ 、 18.3° に観察された (Fig.46 c)。また、 γ CD 単独粉砕物では、特徴的な回折ピークは確認されず、ハローパターンを示した (Fig.46 d)。PM (TPN/ γ CD=2/1) および PM (TPN/ γ CD=4/1) では $2\theta=14.5^\circ$ 、 26.2° 付近に TPN 結晶由来の回折ピークが、 $2\theta=12.2^\circ$ 、 18.8° 付近に γ CD 由来の回折ピークがそれぞれ観察された (Fig.46 e, f)。一方、GM (TPN/ γ CD=1/1)、GM (TPN/ γ CD=2/1) および GM (TPN/ γ CD=3/1) においては、TPN 結晶由来の回折ピークおよび γ CD 由来の回折ピークは観察されず、ハローパターンを示した (Fig.46 g-i)。

一般的に、混合粉砕法により包接複合体が形成されると非晶質化することが知られている。 γ CD との混合粉砕により TPN 結晶構造中における結晶格子の規則性が乱れることで結晶性の低下が起こり、非晶質になった可能性、もしくはメカノケミカル反応が進行し包接複合体を形成することで、TPN 結晶とは異なった結晶構造に変化する過程で非晶質になった可能性が推察された。

また、非晶質化した試料を調湿保存することにより、結晶化が起こることが知られている。そこで、混合粉砕によりハローパターンを示した GM (TPN/ γ CD=2/1) および GM (TPN/ γ CD=4/1) を調湿保存後、PXRD 測定を行った。その結果、結晶化されても回折パターン中には TPN および CD 由来の回折ピークは確認されず、GM (TPN/ γ CD=2/1) 調湿物および GM (TPN/ γ CD=4/1) 調湿物は、 $2\theta=7.5^\circ$ 、 12.0° および 16.7° 付近に、新規の回折ピークが観察された (Fig.46 l, m)。一般的に tetragonal columnar 型にて包接複合体を形成している場合、特徴的な回折ピークは、 $2\theta=7.4^\circ$ 、 12.1° および 16.5° 付近に観察されることが知られている¹⁰⁸⁾。GM (TPN/ γ CD=2/1) 調

湿物、GM (TPN/ γ CD=4/1) 調湿物およびCPの回折パターン中には γ CDのtetragonal columnar型構造に類似する回折ピーク ($2\theta=7.3^\circ$ 、 12.0° および 16.5°) が認められたことから、tetragonal columnar型の構造にてTPNと γ CDの複合体形成しているものと推察された。

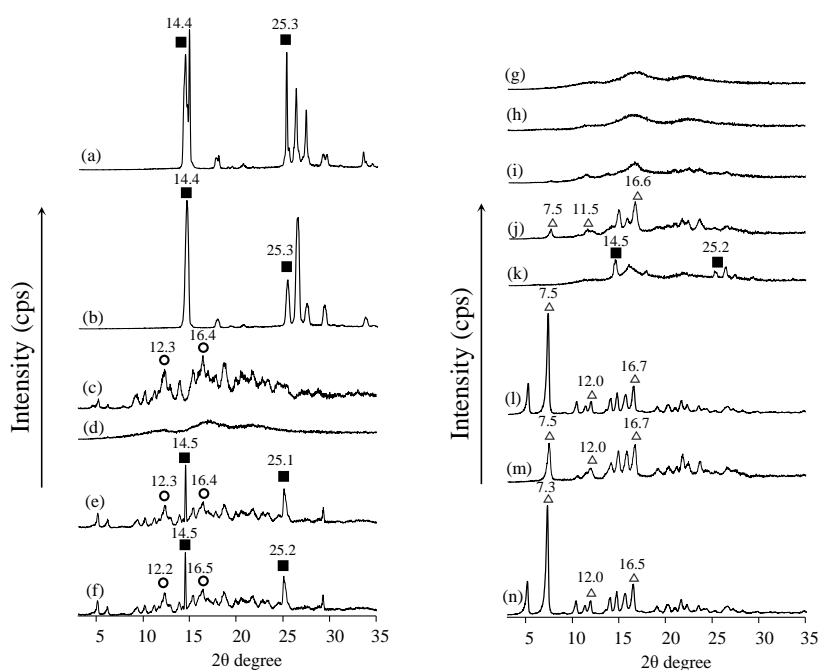


Fig. 46 PXRD patterns of TPN/γCD systems.

(a) TPN intact, (b) TPN ground, (c) γCD, (d) γCD ground, (e) PM (TPN/γCD=2/1), (f) PM (TPN/γCD=4/1), (g) GM (TPN/γCD=1/1), (h) GM (TPN/γCD=2/1), (i) GM (TPN/γCD=3/1), (j) GM (TPN/γCD=4/1), (k) GM (TPN/γCD=5/1), (l) GM (TPN/γCD=2/1) humidified, (m) GM (TPN/γCD=4/1) humidified, (n) CP (TPN/γCD).

■:TPN, ○:γCD, △: tetragonal columnar form

香料などの昇華特性を有する熱的に不安定な物質を CD で包接することで、昇華抑制などの熱的安定化を得ることができる¹⁰⁹⁾。TPN は低融点物質であるため、TG 測定により複合体形成に伴う TPN 分子の揮発性変化について検討を行った (Fig.47)。TPN 単独において 54.8°C 付近から約 99% の TPN 結晶由来の重量減少が確認された。また、30-100°C 付近にかけて GM (TPN/ γ CD=2/1) で 11.5%、GM (TPN/ γ CD=4/1) で 6.0% および CP (TPN/ γ CD) で 5.4% の重量減少が確認された。これらの重量減少は、TG 曲線の減少度合から推定して、CD の結晶水または付着水の蒸発に由来するものと推察した。GM (TPN/ γ CD=2/1) では、157°C 付近から 260°C にかけて約 11.2% の重量減少が確認された。この重量減少は、試料に含有される TPN の 91.3% に相当した。GM (TPN/ γ CD=4/1) では、100°C 付近から 178°C にかけて約 8.0%、178°C 付近から 260°C にかけて約 9.7% の重量減少が確認されている。この重量減少は、試料に含有される TPN の 98.3% に相当した。CP では、153°C 付近から 260°C にかけて約 14.7% の重量減少が確認された。以上の結果より、TPN/CD は熱的に安定な複合体を形成していると推察された。

GM および CP において 157°C 付近から観察されたそれぞれの重量減少は、TPN/ γ CD 複合体形成によるものと推察された。GM (TPN/ γ CD=2/1) と CP (TPN/ γ CD) では同様の重量減少が確認されたことより、同じ分子状態の TPN の存在が推察された。しかしながら、GM (TPN/ γ CD=4/1) において、100-178°C および 178-260°C において二段階の重量減少が確認されたことより、複合体中に GM (TPN/ γ CD=2/1) と分子状態の異なる TPN の存在が推察された。

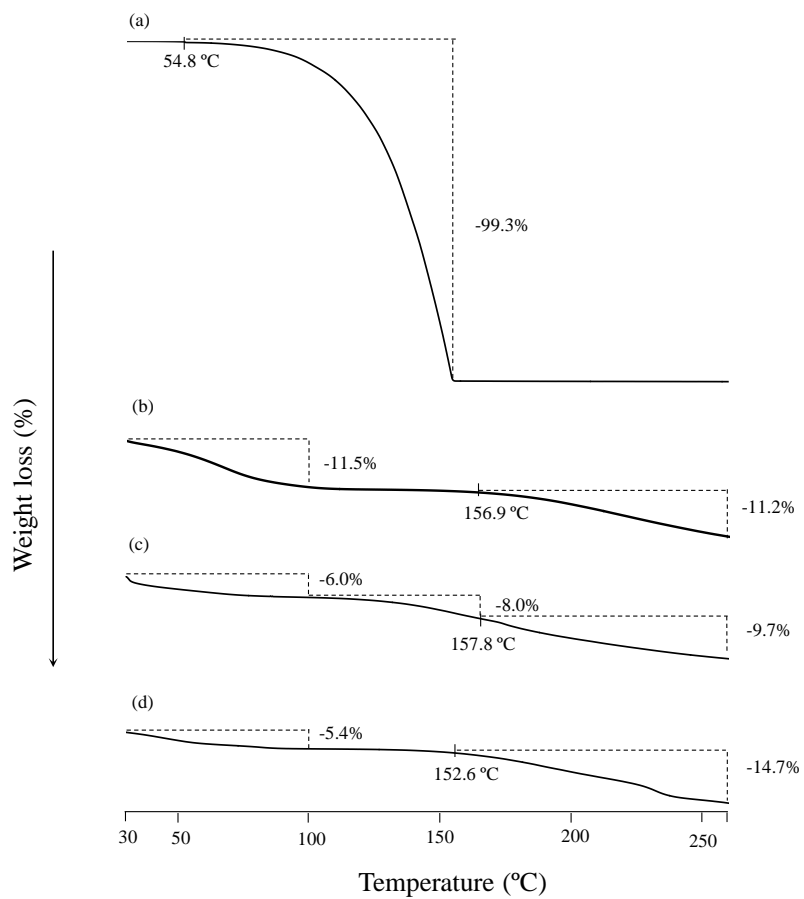


Fig. 47 TG curves of TPN/ γ CD systems.
 (a) TPN intact, (b) GM (TPN/ γ CD=2/1), (c) GM (TPN/ γ CD=4/1), (d) CP (TPN/ γ CD).

3-3 TPNと γ CDとの包接モル比の検討

PXRD 測定、DSC 測定および TG 測定の結果より、混合粉砕物および共沈物において TPN/ γ CD の分子間相互作用が確認された。そこで CP の包接モル比を検討するために、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定を行った¹¹⁰⁾。TPN、 γ CD、GM (TPN/ γ CD=4/1) および CP の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定の結果を Fig. 48 に示した。TPN では、7.0-7.5 ppm 付近に七員環のプロトンに由来するシグナルが観察された。 γ CD ではグルコースユニットのプロトンおよびヒドロキシル基に由来するシグナルが観察された。CP では TPN と γ CD 由来のシグナルがそれぞれ確認された。7.0-7.41ppm 付近に観察された TPN の七員環のプロトンに由来するシグナルの積分値が 1.32 であることから、CP における TPN の 1 水素原子あたりの積分値は 0.264 であることが示された。また、 γ CD のグルコースユニットの H-1 に由来するシグナルの積分値が 1 であることから、 γ CD の 1 水素原子あたりの積分値は 0.125 であることが示された。この結果から式 (1) を用いて CP の包接モル比を算出すると、TPN/ γ CD=2.15/1 であった。以上の結果から γ CD と TPN の包接複合体形成のモル比は TPN/ γ CD=2/1 であることが確認された⁶¹⁾。

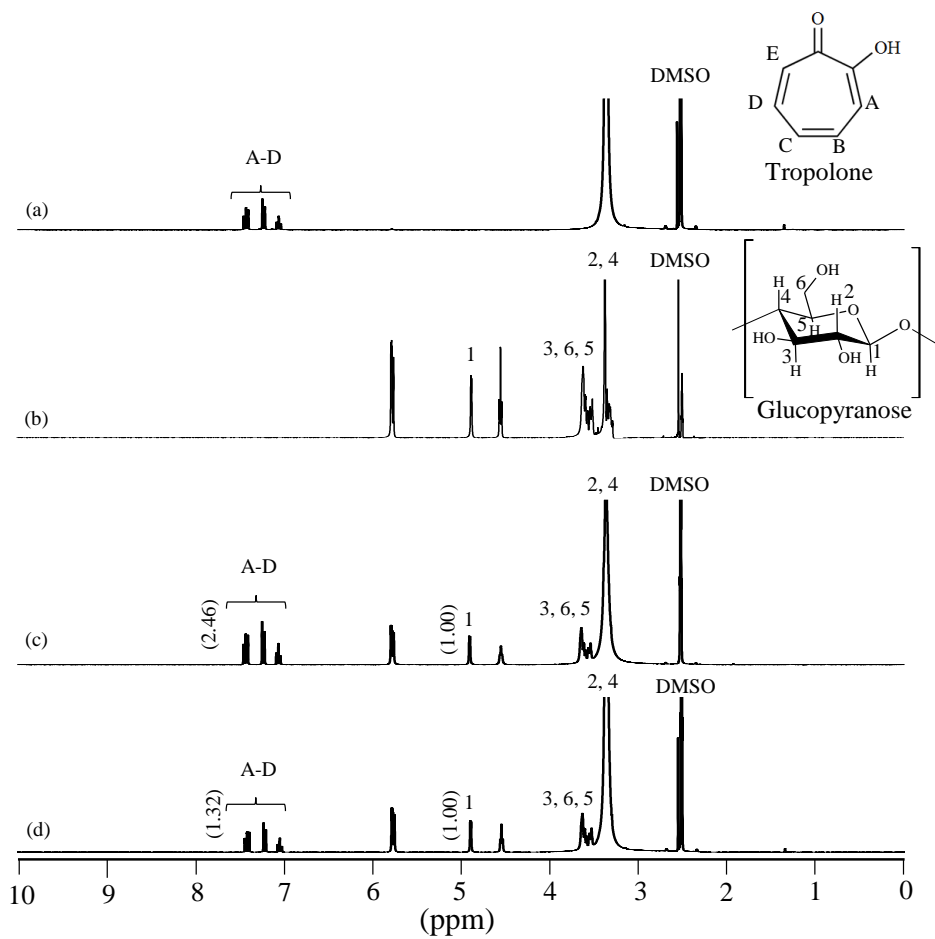


Fig. 48 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) spectra of TPN/ γCD systems.

(a) TPN intact, (b) γCD , (c) GM (TPN/ γCD =4/1), (d) CP (TPN/ γCD).

3-4 固体状態における分子状態の検討

DSC、TG および PXRD において、TPN と γ CD の分子間相互作用が推察された。そこで、固体状態における分子状態を検討するために FT-IR スペクトル測定を行った (Fig.49)。

TPN 単独において TPN 分子構造中のカルボニル基 (C=O 伸縮振動) 由来の 1613 cm^{-1} 付近の吸収スペクトルおよびヒドロキシ基 (O-H 伸縮振動) 由来の 3198 cm^{-1} 付近の吸収スペクトルが観察された (Fig.49 a)。 γ CD 単独では 3387 cm^{-1} を中心として $3800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ 間にヒドロキシ基 (O-H 伸縮振動) 由来のブロードな吸収スペクトルが確認された (Fig.49 b)。PM (TPN/ γ CD=2/1) および PM (TPN/ γ CD=4/1) においても、TPN 分子構造中のカルボニル基およびヒドロキシ基に由来する吸収スペクトルが TPN 結晶と同様に認められた (Fig.49 c, d)。しかしながら、TPN 由来のカルボニル基 (C=O 伸縮) 由来の 1613 cm^{-1} 付近の吸収スペクトルが GM (TPN/ γ CD=2/1) では 1612 cm^{-1} 、GM (TPN/ γ CD=4/1) では 1611 cm^{-1} 、CP では 1610 cm^{-1} に低波数シフトしていることが観察された (Fig.49 e-g)。また、GM (TPN/ γ CD=2/1)、GM (TPN/ γ CD=4/1) および CP では、ヒドロキシ基 (O-H 伸縮) 由来の 3198 cm^{-1} 付近の吸収スペクトルの消失または高波数側へのシフトが観察された。TPN は、その結晶構造において分子間水素結合を介した 2 量体を形成することが報告されている¹¹¹⁾。本研究にて観察されたスペクトルシフトは、TPN の 2 量体を形成していた分子間水素結合が切断され、新たに TPN と γ CD 間で分子間相互作用が形成されたことによるものと推察された。GM (TPN/ γ CD=4/1) は、Higashi らが報告している γ CD の分子空間を利用した、サリチル酸/ γ CD 包接複合体で示された結果と同様の結果を示した¹¹²⁾。よって、本研究における GM (TPN/ γ CD=4/1) においても γ CD の空洞内に 2 分子の TPN、分子空間に TPN が 2 分子存在していることが示唆された。

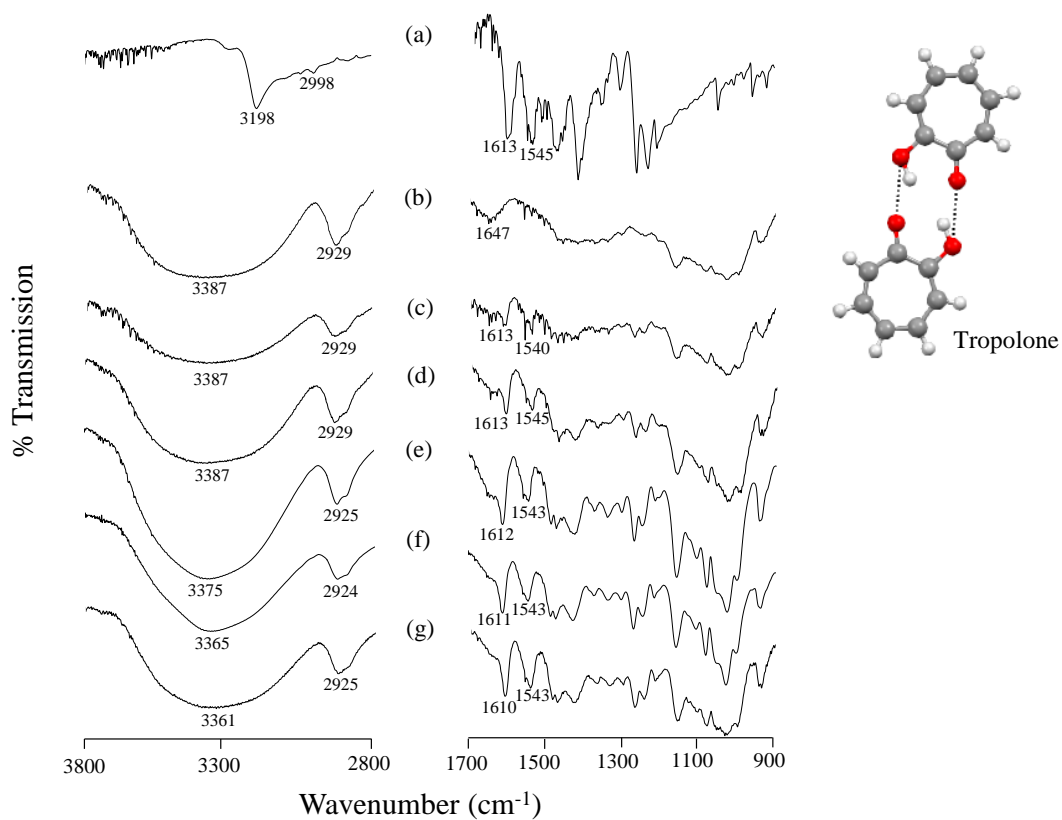


Fig. 49 FT-IR spectra of TPN/γCD systems.

(a) TPN intact, (b) γCD, (c) PM (TPN/γCD=2/1), (d) PM (TPN/γCD=4/1), (e) GM (TPN/γCD=2/1), (f) GM (TPN/γCD=4/1), (g) CP (TPN/γCD).

3-5 溶液状態における分子間相互作用の検討

固体状態における TPN と γ CD の複合体形成が明らかとなった。また、調製法の違いにより、異なる複合体を形成していることが推察された。そこで、水溶液中における各 TPN/ γ CD 複合体の分子状態の評価を行うために、 ^1H - ^1H NOESY NMR 測定を行った。

GM (TPN/ γ CD=2/1) において、TPN の七員環に由来する H-A, H-B, H-D および H-E ピークと γ CD の H-3, H-5 および H-6 ピーク間でクロスピークが確認された (Fig.50)。GM (TPN/ γ CD=4/1) では、TPN の七員環に由来する H-A, H-B, H-D および H-E ピークと γ CD の内側に位置する H-3, H-5 および H-6 ピーク間および γ CD の外側に位置する H-2, H-4 間でクロスピークが確認された (Fig.51)。また、CP では、TPN の七員環に由来する H-A, H-B, H-D および H-E ピークと γ CD の内側に位置する H-5, H-6 ピーク間でクロスピークが確認された (Fig.52)。

^1H - ^1H NOESY NMR 測定の結果より、GM (TPN/ γ CD=2/1) は TPN の七員環部分が γ CD の広い縁の近くに位置することが推察された。TPN の H-A および H-E と γ CD の H-6 間でクロスピークが確認されていることから、TPN のカルボニル基およびヒドロキシ基側は γ CD の狭い縁側に位置していると推察した (Diagram1 a)。一方、GM (TPN/ γ CD=4/1) では 2 分子の TPN の七員環が空洞内に入っており、 γ CD の狭い縁の近くに位置することが推察された。さらに、 γ CD の外側に位置する H-2, 4 とのクロスピーク¹¹³⁾が確認されたことから、残りの 2 分子の TPN は γ CD 同士で形成される分子空間に存在していると推察された (Diagram1 b)。CP は、TPN の七員環が γ CD の狭い縁の近くに位置することが推察された。特に、TPN の H-A, H-B, H-D および H-E と γ CD の H-5 および H-6 間でクロスピークが確認され、TPN の H-C と γ CD の H-6 間でクロスピークが確認されたことから、TPN のカルボニル基およびヒドロキシ基側から入っており、 γ CD の狭い縁側に位置していると推察した (Diagram1 c)。以上の結果から、

TPN と γ CD は調製法の違いにより異なる包接様式をとることが確認された。

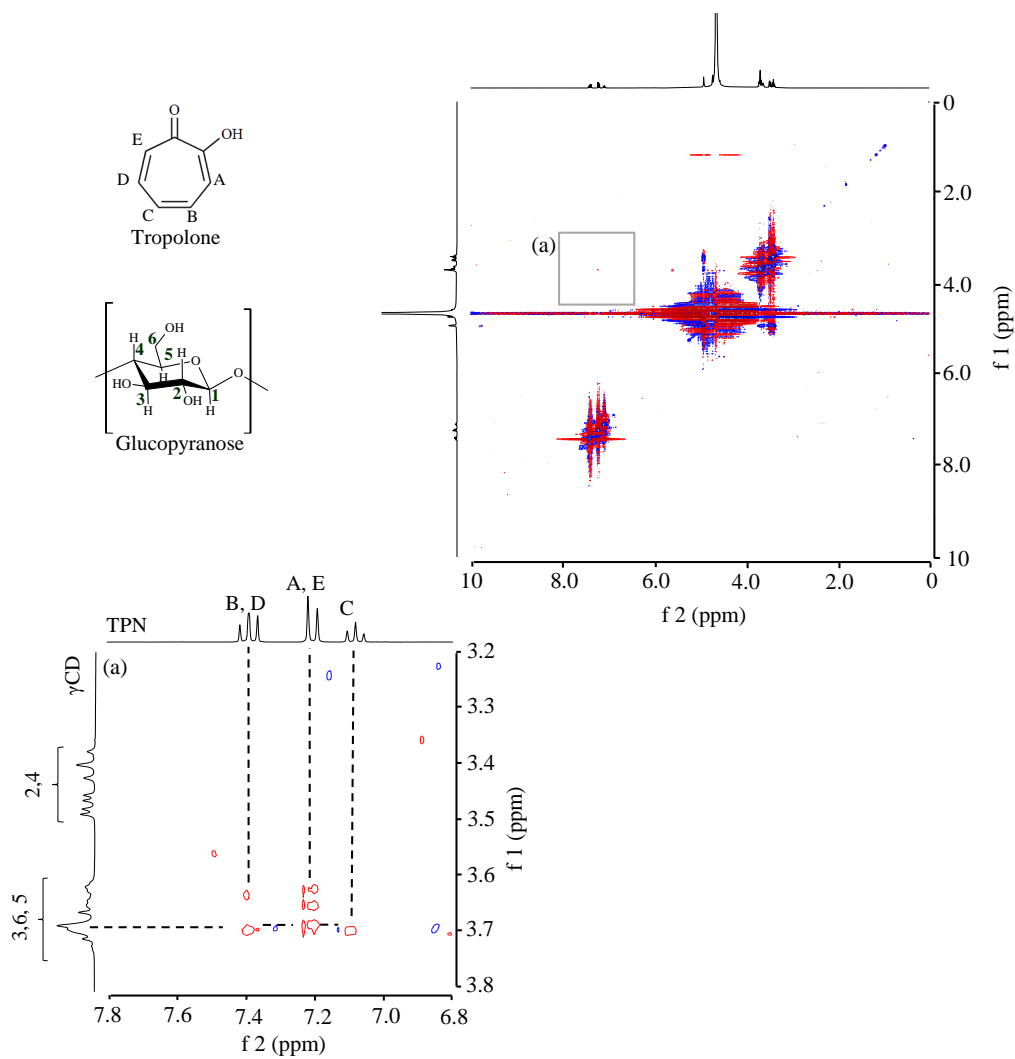


Fig. 50 ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum of GM (TPN/ γCD =2/1).

(a) GM (molar ratio of TPN/ γCD = 2/1) X is 6.8-7.8 and the Y axis is 3.2-3.8.

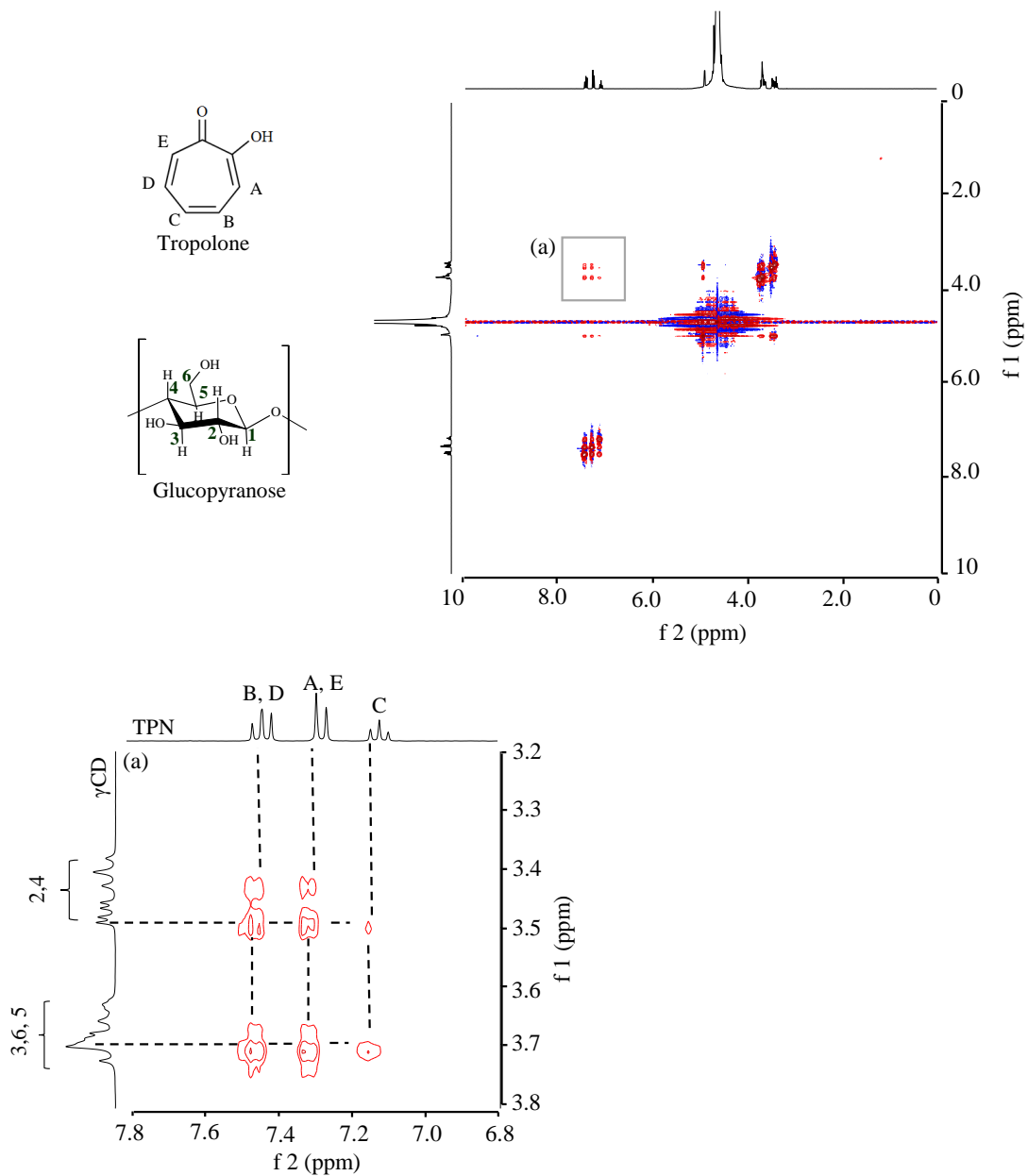


Fig. 51 ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum of GM (TPN/ γCD =4/1).

(a) GM (molar ratio of TPN/ γCD = 4/1) X is 6.8-7.8 and the Y axis is 3.2-3.8.

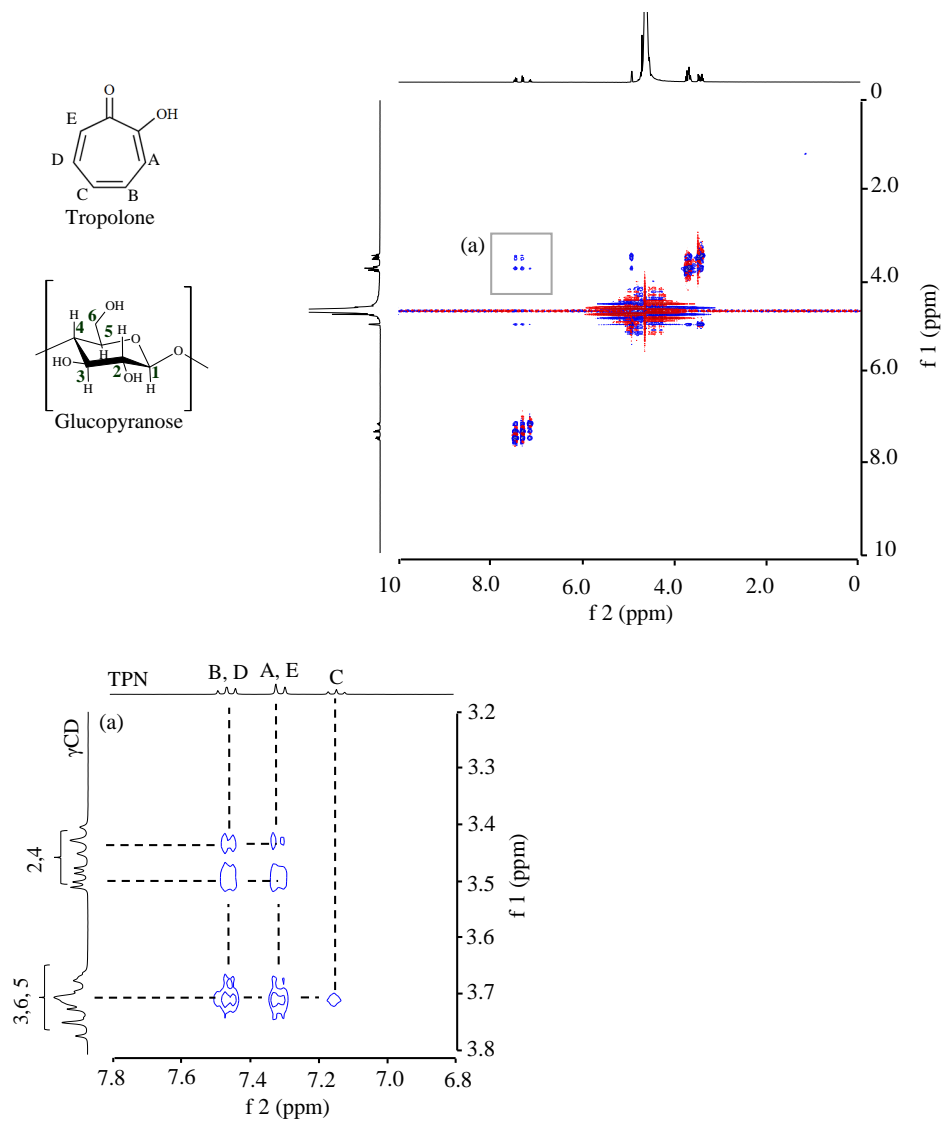


Fig. 52 ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum of CP (TPN/ γ CD).

(a) CP (TPN/ γ CD) X is 6.8-7.8 and the Y axis is 3.2-3.8.

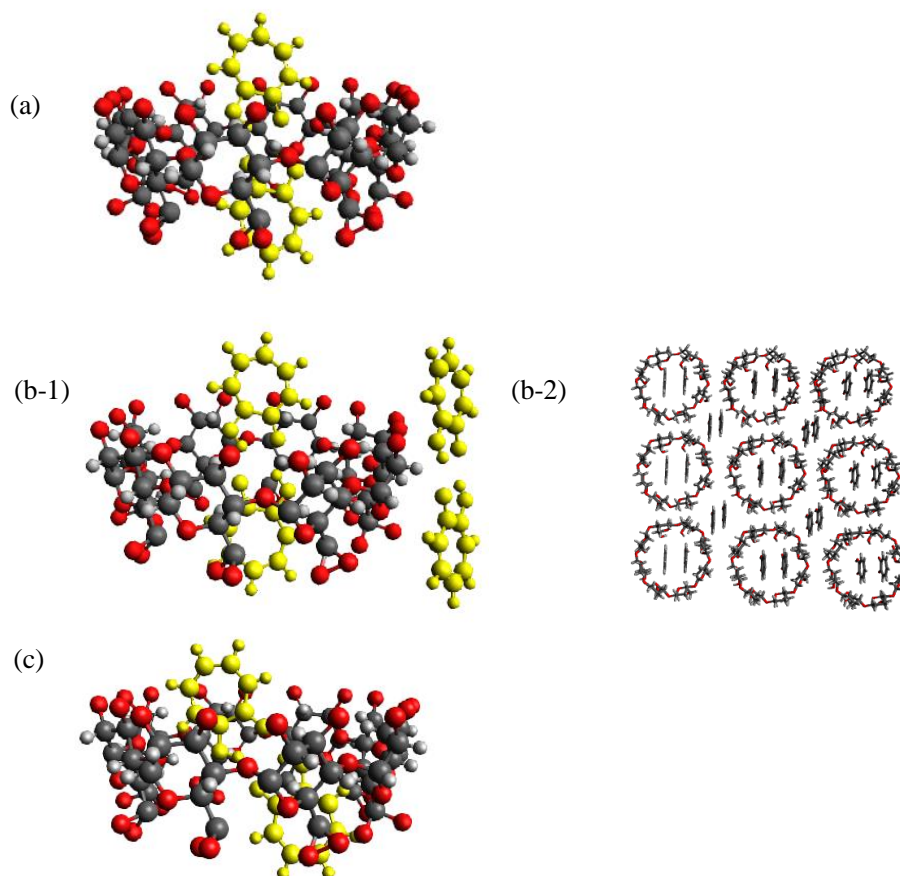


Diagram1 Structural view of TPN/γCD complex.

(a) GM (TPN/γCD=2/1), (b-1) GM (TPN/γCD=4/1) side view,
 (b-2) GM (TPN/γCD=4/1) top view, (c) CP (TPN/γCD=2/1).

第3節 小括

混合粉碎法および共沈法を用いた固体状態における TPN/ γ CD および包接複合体形成が明らかとなった。熱不安定物質である TPN は、CD による熱的に安定な複合体を形成していることが確認された。よって、揮発性を有する TPN の製剤工夫として CD が有用であることが示された。

TPN/ γ CD は、調製法によって異なる包接複合体を形成しており、包接複合体のモル比は、混合粉碎法では TPN/ γ CD=2/1 および TPN/ γ CD=4/1 であり、共沈法では TPN/ γ CD=2/1 であった。また、GM (TPN/ γ CD=4/1) は、2 分子の TPN が γ CD 同士で形成される分子空間に封入していることが明らかとなった。これまで、加熱密封法などの溶液状態での調製が報告されているが、固体状態での調製法である混合粉碎法を用いた CD 同士の分子空間への薬物の封入は、興味深い新たな発見となった。今後さらに、この特異的な CD 同士で形成される分子空間への薬物の封入メカニズムを解明することで、医薬品開発における CD の薬物キャリアとしての利用の幅が広がるであろう。

第1章 総括

第1章にて、混合粉砕法により HT/CDs 包接複合体の形成が確認された。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となった。

得られた HT/CDs 複合体の溶出挙動は、用いた CD の特性に応じて異なることが確認された。その特性は、CD 分子中における HT の包接構造が起因しており、その結果、HT の溶出コントロールが可能となった。

HT および TPN とで γ CD との複合体構造に違いが生じた要因として、ゲスト分子である HT と TPN の化学的性質が起因していることが予想された。混合粉砕によるメカノケミカル効果によって、HT 同士または TPN 同士の分子内・分子間水素結合の切断により、その度合いに応じて複合体が形成された。もしくは、イソプロピル基の有無による両者の水溶性の違い、もしくは立体的構造の違いが γ CD の空洞内と分子空間との親和性に影響した可能性がある。

以上より、混合粉砕による機械的な力が加わることで生じる摩擦、衝突および粉砕熱によるメカノケミカル効果によって、HT および TPN とは共通の構造を持ちながら異なる複合体形成をするといった興味深い結果を得られた。

HT/CDs 複合体形成は、CD の特性に応じて複合体形態が変化し、HT の安定化および放出性コントロールを可能とすることで、多分野への HT の利用拡大の礎となることが期待される。

第 2 章 抗菌成分である HT/CDs 複合体の有用性の評価

第 2 章 序

ヒノキチオール (HT) は、日常生活で問題となる大腸菌、黄色ブドウ球菌そして、院内感染で問題視されている緑膿菌や MRSA への抗菌活性を示すことが知られている¹¹⁴⁾。また、ヒノキチオールは抗ウイルス効果も期待でき、ノロウイルス対策に用いることが可能である。

第 1 章において HT と各種 CD との複合体形成が確認され、CD の種類に応じた異なる包接様式をとることが確認された。また、HT の溶出性の評価では、HT/CDs 複合体形成に伴う HT の溶出性の向上が確認され、包接構造の違いが反映した異なる HT の溶出プロファイルを示した。、抗菌成分の寒天培地中での拡散速度および拡散度合いが、抗菌活性を評価する上で影響因子として働く。よって、HT 単独に対し、CD に包接された HT/CDs の抗菌活性が、細菌に対してどのような影響を与えるか検証する必要がある。

一般的に、抗菌成分を CD で包接することで、ゲスト分子の抗菌活性へ影響を与えることが知られている¹¹⁵⁾。そこで、HT/CDs 複合体形成が HT の抗菌活性にどのような影響を及ぼすかを確認するために抗菌試験を行った。また、HT の皮膚適用を見据えて、HT および HT/CD 複合体における皮膚刺激性を評価した。

第 1 節 HT/CDs 複合体における抗菌活性の評価

1-1 HT における抗菌活性の検討

HT は、臨床現場および日常生活で感染症を引き起こす細菌に対して抗菌活性を示すことから、感染拡大防止における手指の除菌製剤としての利用が期待できる。本研究では、手指消毒薬としての HT の有用性を評価するために、4 種の細菌（枯草菌 *Bacillus subtilis*、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*、大腸菌 *Escherichia coli* および緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa*）を選択し、4 種の細菌に対する寒天希釈法を用いて抗菌試験を行い、MIC を算出した（Table 1）。

HT 単独の MIC は枯草菌（80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、黄色ブドウ球菌（160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、大腸菌（80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）および緑膿菌（320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を示した。HT 単独粉末物は、HT 結晶の MIC とほぼ同様の値を示した。

HT の細菌に対する MIC はいくつか報告があり^{116, 117}、例えば枯草菌は MIC: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、黄色ブドウ球菌は MIC: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および緑膿菌は MIC: 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と、今回算出された MIC 値は既報の MIC と大きな差はみられなかった。よって、算出された HT の MIC 値は妥当であると考えられた。

1-2 HT/CDs 複合体における細菌に対する最小発育阻止濃度(MIC)の算出

HT の 4 種の細菌に対する MIC は、枯草菌 (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、黄色ブドウ球菌 (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、大腸菌 (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および緑膿菌 (320 $\mu\text{g}/\text{mL}$) であった。HT/CD 複合体における HT の抗菌活性の影響を評価するために、寒天希釈法を用いて MIC 値を算出した (Table 1)。

はじめに、各 CD 単独のみを添加した際の抗菌活性評価を行った。しかしながら、今回実施した濃度では全ての CD においてコロニーの形成が確認されたことから、MIC 値は算出されなかった。よって、今回用いた各 CD 濃度では、4 種の細菌に対して抗菌活性はないものと判断した。

物理的混合物と混合粉砕物は、HT の濃度に換算し、仕込み量を設定した。PM (HT/ α CD=1/2)、PM (HT/ β CD=1/1)、PM (HT/ γ CD=1/1)、PM (HT/HP β CD=1/1)、PM (HT/M β CD=1/1)、PM (HT/TA β CD=1/1) および PM (HT/HP γ CD=1/1)では、2 種のグラム陽性菌に対する MIC 値の低下が確認され、グラム陰性菌では HT 単独と同様の MIC を示した。一方、GM (HT/ α CD=1/2)、GM (HT/ β CD=1/1)、GM (HT/ γ CD=1/1)、GM (HT/HP β CD=1/1)、GM (HT/M β CD=1/1)および GM (HT/HP γ CD=1/1)は、枯草菌 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、黄色ブドウ球菌 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および大腸菌 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の MIC 値を示し、HT 単独と比較して約 4 倍抗菌性の向上が確認された。また、GM (HT/ α CD=1/2)、GM (HT/ β CD=1/1)、GM (HT/ γ CD=1/1)、GM (HT/HP β CD=1/1)、GM (HT/M β CD=1/1) および GM (HT/HP γ CD=1/1) の MIC は、緑膿菌(160 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を示し、HT 単独と比較して約 2 倍の抗菌性の向上が確認された。GM (HT/TA β CD=1/1) では、枯草菌 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、黄色ブドウ球菌 (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、大腸菌 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および緑膿菌 (320 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の MIC 値を示した。

Aleem らの報告によると、抗生物質であるセフジニルを β CD および誘導体である HP β CD を用いて包接複合体を形成することにより黄色ブドウ球菌および大腸菌の 2

種の細菌に対するセフジニルの抗菌活性が向上したとの報告がある¹¹⁸⁾。セフジニルの抗菌活性向上には、CD との包接複合体を形成することにより、難溶解性であるセフジニルを可溶化し、安定性を向上したことが寄与している。本研究において、包接複合体形成に伴い HT の抗菌性が向上したことは HT の溶解性改善が反映していると推察された。また、 β CD でクロロゲン酸を包接することにより、クロロゲン酸の安定性が改善し、クロロゲン酸の抗菌性が損なわれることなく、抗菌性向上に寄与したとの報告がある¹¹⁹⁾。精油成分であるカルバクロールを β CD で包接することで、カルバクロールの抗菌活性が向上したとの報告がある¹²⁰⁾。このメカニズムとして、 β CD で包接することで細菌の細胞膜内へカルバクロールの到達を増強させたことが寄与していると結論付けている。

HT の抗菌および殺菌作用のメカニズムは、細菌の細胞膜の透過性および呼吸に関連した細胞膜の代謝障害によるものであるとされている¹²¹⁾。また、グラム陽性細菌に対する精油の抗菌作用は、細菌の細胞壁および細胞質膜の破壊、微生物の細胞質内容物の漏出およびその後のその不活性化をもたらすことが知られている¹²²⁾。これらより、HT は精油特有の抗菌活性を示している可能性が考えられた。また、HT は七員環構造にヒドロキシ基を有する構造であるため、フェノール性の抗菌性を示していることが予想される。複合体形成により HT と CDs との分子間相互作用により、細菌に対する MIC 値が低下したと推察された。また、そのメカニズムとして CD で包接することによる HT の効率的な細胞膜への到達が関与しているという仮説を立て、細菌の膜に対する影響を評価することとした。

Table 1 Antimicrobial activity of HT/CDs systems.

Samples	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>B.sub</i>	<i>S.a</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aer</i>
CDs	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HT intact	80	160	80	320
HT ground	40	40	80	320
PM (HT/ α CD=1/2)	40	80	80	320
PM (HT/ β CD=1/1)	40	80	80	320
PM (HT/ γ CD=1/1)	40	80	80	320
PM (HT/M β CD=1/1)	40	80	80	320
PM (HT/TA β CD=1/1)	40	80	80	320
PM (HT/HP β CD=1/1)	40	80	80	320
PM (HT/HP γ CD=1/1)	40	80	80	320
GM (HT/ α CD=1/2)	20	40	20	160
GM (HT/ β CD=1/1)	20	40	20	160
GM (HT/ γ CD=1/1)	20	40	20	160
GM (HT/M β CD=1/1)	20	40	20	160
GM (HT/TA β CD=1/1)	40	80	40	320
GM (HT/HP β CD=1/1)	20	40	20	160
GM (HT/HP γ CD=1/1)	20	40	20	160

B. sub : *Bacillus subtilis*

E. coli : *Escherichia coli*

S. a : *Staphylococcus aureus*

P. aer : *Pseudomonas aeruginosa*

All MIC values are converted to HT concentration.

n.d.: not determined.

1-3 HT の時間依存的抗菌活性の評価

Time-kill assay は、一般的に細菌に対する経時的な殺菌・静菌効果を評価するために用いられている手法である^{123, 124)}。また、抗菌物質と微生物株との動的相互作用に関する情報を得ることができる手法である。そこで、HT および HT/CD 包接複合体形成による細菌に対する時間依存的抗菌作用を評価するためにグラム陰性菌である大腸菌を用いて Time-kill assay を行った。

殺菌効果は、Colony Forming Unit (CFU) /mL の 3Log 減少または指定時間 (99.9%) の殺滅として定義される¹²⁵⁾。HT を添加していない control 群では、試験開始直後 (0 時間) 値から、一定の生菌数が確認された。一方、HT 単独 (320 µg/mL) において 3 時間で control と比較し、顕著な生菌数の減少が確認され、6 時間で検出限界となった (Fig.53)。一般的に、6 時間で 90% の死滅は、24 時間で 99.9% の殺傷に相当する¹²⁶⁾。このことから、HT は高濃度では大腸菌に対して殺菌的に効果を示すことが推察された。一方、HT 単独 (160 µg/mL) は、24 時間にかけて経時的に生菌数の減少が確認され、24 時間値で検出限界を示した。また、寒天希釈法で算出した、大腸菌における MIC 値である HT 単独 (80 µg/mL) は、3 時間で生菌数の減少が認められ、その後 24 時間値にかけて緩やかな生菌数の減少が確認された。

HT は、濃度依存的に微生物の増殖を遅延することが報告されている¹²⁷⁾。本研究で得られた結果は、これまでの報告と相関するものであった。よって HT は、濃度依存的に細菌の増殖を抑制することが示された。

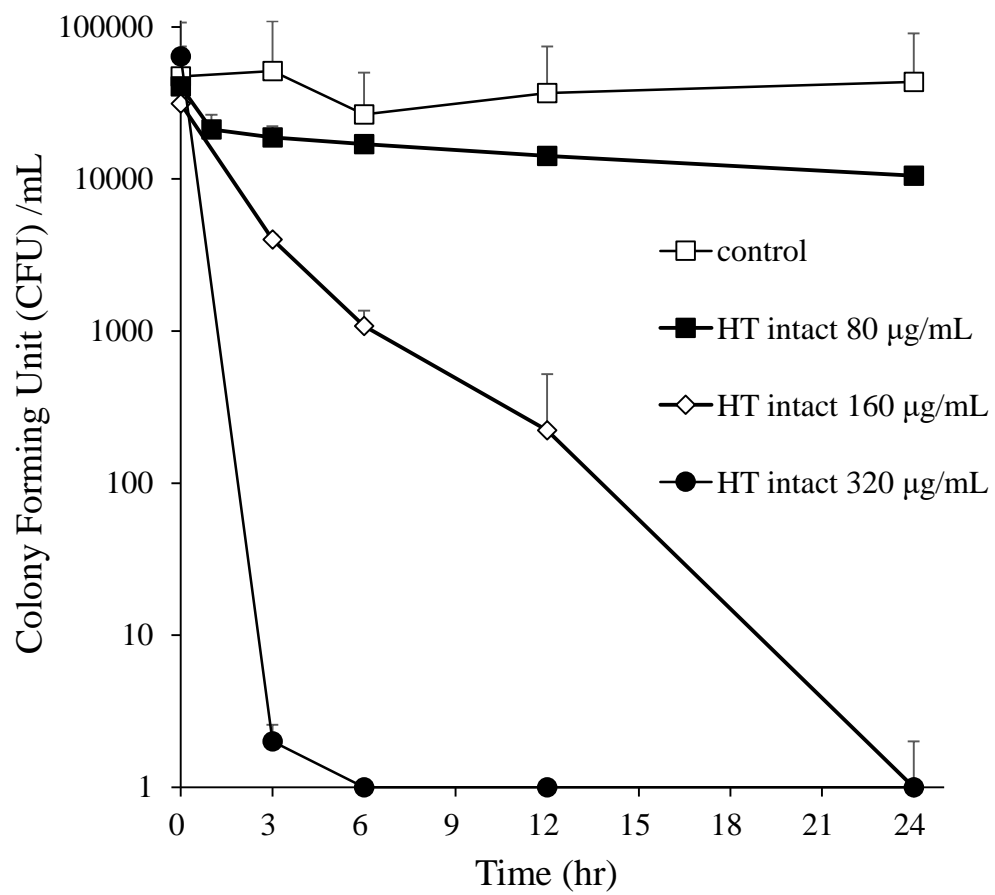


Fig. 53-1 Time-kill curves for *E. coli*.

1-4 HT/CDs 複合体の時間依存的抗菌活性の評価

HT 単独において異なる濃度で大腸菌の増殖抑制挙動が異なることが確認された。そこで、HT/CDs 複合体における大腸菌に対する増殖抑制作用に及ぼす影響を評価するために同様の条件で Time-kill assay を行った。

はじめに、各 CD 単独での大腸菌に対する増殖抑制効果を検討した。水溶液中に、各 CD 単独および調製した大腸菌液を添加し、24 時間振盪した。その結果、データは示していないが、CD 単独では control 群とほぼ同等の挙動を示すことが確認された。よって、今回の実施濃度では CD は大腸菌の増殖抑制効果は示さないことが確認された。また、生菌数の増加も確認されないことから、CD は大腸菌の増殖に影響を与えないことが推察された。

GM (HT/ α CD=1/2)、GM (HT/ β CD=1/1) および GM (HT/ γ CD=1/1) を用いて同様の試験を実施した。HT 濃度:80 μ g/mL の GM (HT/ α CD=1/2)、GM (HT/ β CD=1/1) および GM (HT/ γ CD=1/1) は、24 時間で生菌数が約 10^{-1} まで緩やかに低下した (Fig.53-3)。HT 単独と比較して、GM (HT/ α CD=1/2)、GM (HT/ β CD=1/1) および GM (HT/ γ CD=1/1) において段階で大腸菌の増殖を抑えることが確認された。用いる CD は、 γ CD > α CD > β CD の順で速い増殖抑制を示した。特に、GM (HT/ γ CD=1/1) は時間依存的に増殖抑制を示すことが確認された。同濃度の HT 含有の PM (HT/ α CD=1/2)、PM (HT/ β CD=1/1) および PM (HT/ γ CD=1/1) では、HT と同様の挙動を示すことが確認された。また、用いる CD による大腸菌への影響に大きな違いは見られなかった。一方、高濃度 (HT 濃度:320 μ g/mL) では、GM (HT/ α CD=1/2)、GM (HT/ β CD=1/1) および GM (HT/ γ CD=1/1) は HT 単独と同様の挙動を示した (Fig.53-2)。なかでも、GM (HT/ γ CD=1/1) において、3 時間値で検出限界を示したことから、HT 単独と比較し速やかな増殖抑制を示すことが確認された。一方、GM (HT/ α CD=1/2) および GM (HT/ β CD=1/1) の結果、3 時間値において HT の殺菌効

果の遅延が確認された。GM (HT/ β CD=1/1) においては、12 時間値まで時間経過的にコロニー数が減少したことから、CD で包接されることによる HT の放出抑制が起きていることが考えられた。

HT 単独と比較して HT/CDs 複合体においてより速く大腸菌に対して増殖抑制作用を示した要因として、CD で包接することによる HT の細菌表面への到達速度の増強が考えられた。今回実施した、物理的混合物では HT 単独同様の挙動しか示さなかったため、包接複合体化特有の現象であることが考えられる¹²⁸⁾。Kogawa らによると、細菌表面では、CD 複合体から細菌親油性膜への薬物の分配が起こり、その薬物の薬理学的作用を發揮させることが知られている¹²⁹⁾。本研究において、HT/CDs 複合体が HT 単独と比較し速やかな抗菌作用を示した要因として、CD が HT を細菌表面まで輸送するキャリアとして作用¹³⁰⁾したことが推察された。また、複合体中の HT は、 α CD、 β CD および γ CD で異なる抗菌作用を示したことから、CD と細菌の細胞膜との親和性の違いが細胞膜への到達の速さに起因したと考えられた。

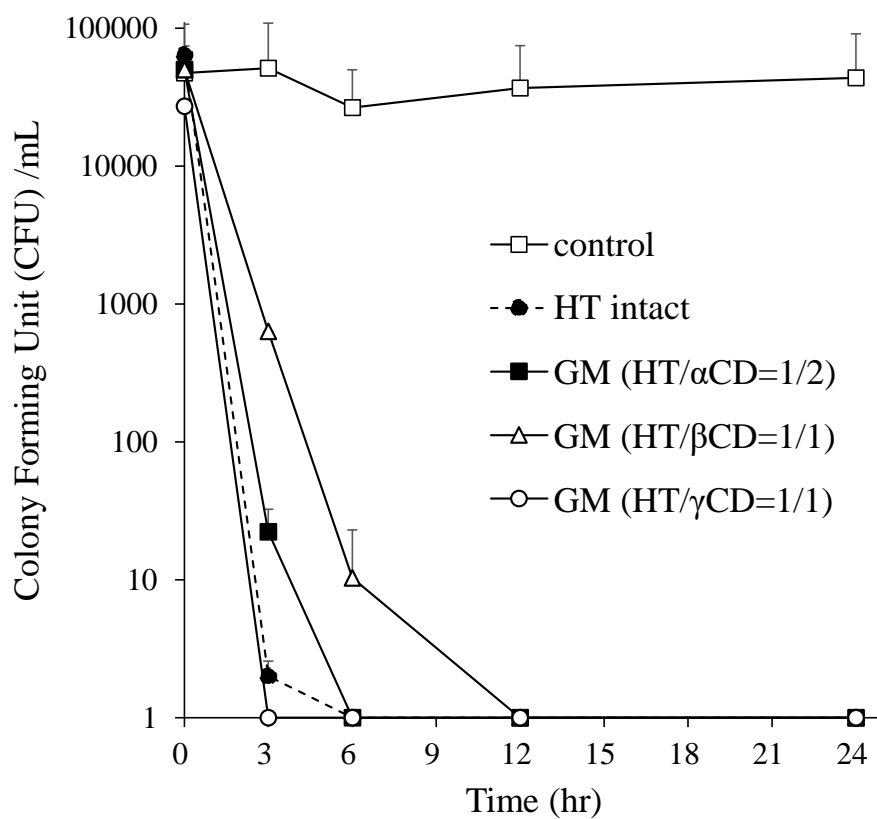


Fig. 53-2 Time-kill curves for *E. coli*.
HT: 320 μg/mL

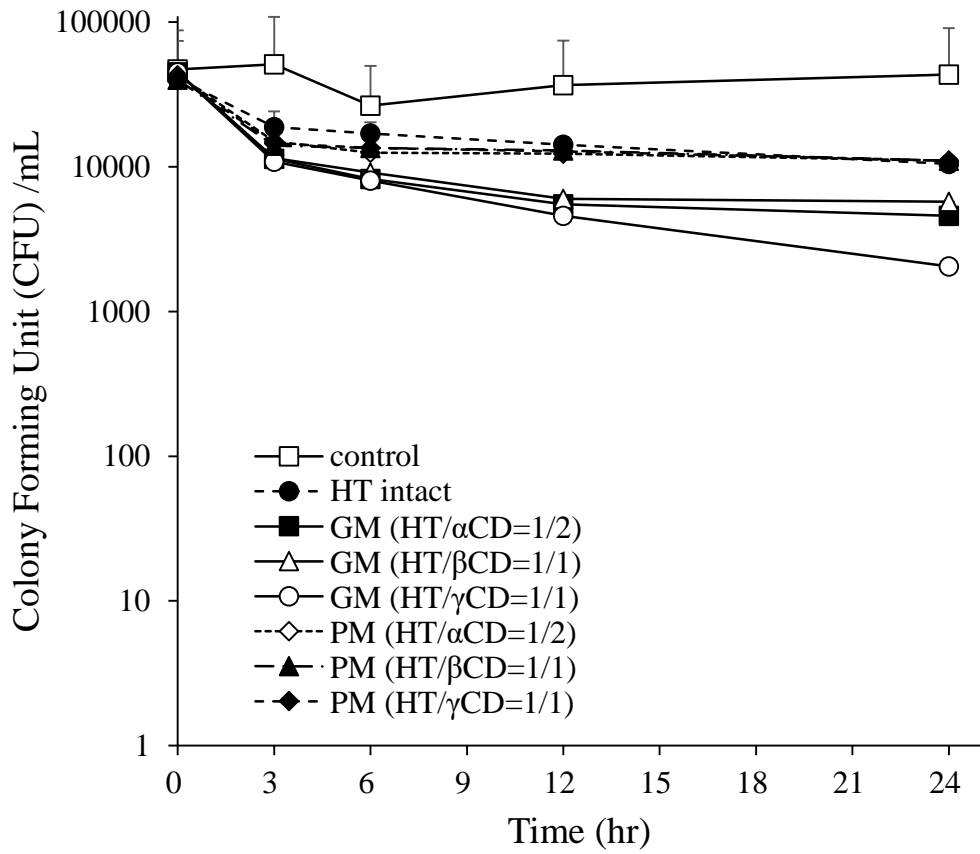


Fig. 53-3 Time-kill curves for *E. coli*.
HT: 80 µg/mL

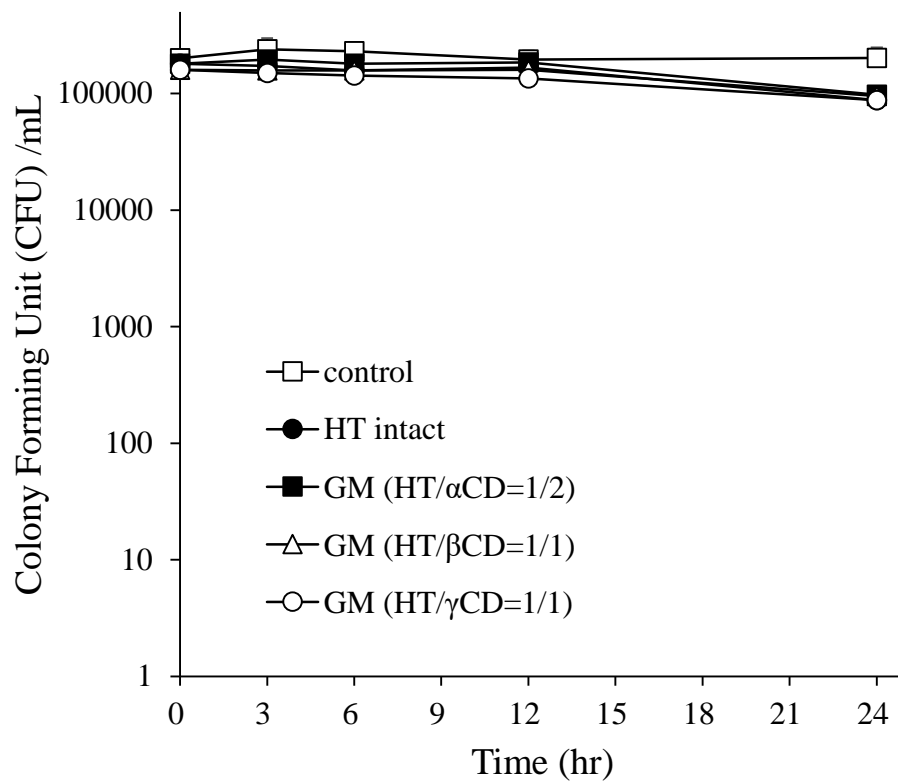


Fig. 53-4 Time-kill curves for *E. coli*.
HT: 40 μg/mL

1-5 HT および CDs における細菌膜電位変化の評価

詳細な HT/CD 包接複合体の抗菌メカニズム解明を行うために、CD 添加による細菌膜電位変化について評価を行った。膜電位は、細胞生理学的過程において重要な役割を果たす。つまり、プロトンの原動力の生成に関与し、ATP 生成、物質輸送、細菌の走化性および低 pH での生存に密接に関与する。膜電位はまた、細胞の膜完全性およびエネルギー状態ならびに生存率を反映する。プロトンの電気化学的勾配は、細菌による ATP の合成および細胞膜を横切る輸送を維持するために必須である。膜電位の損失は、膜の透過性の増加と共にしばしば生じることが知られている。そこで、HT および CD の細菌の膜電位に影響を与えるのか確認するために、膜電位感受性色素 DiBAC₄(3) を用いて試験を行った。測定は、フローサイトメトリー (FCM) を用いた^{131, 132)}。試験菌は、グラム陰性菌である大腸菌を用いた。

膜電位試験の結果、未処理群 (negative control) において 0-10¹ の範囲に DiBAC₄(3) の蛍光強度が確認された (Fig.54)。よって、未処理群は生菌のみであるため、生菌の蛍光強度は 0 に近く、低い蛍光発光を示すことが確認された。一方、加熱処理群 (control) では、10¹-10² の範囲に DiBAC₄(3) の蛍光強度が確認された。よって、加熱処理群は死菌のみであるため、死菌の蛍光強度は 10² に近く、高い蛍光発光を示すことが確認された。細胞膜の脱分極化の補足材である Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone (CCCP) を positive control として試験を実施した。結果は、加熱処理群同様の結果であった。一般的に、低速反応の電位感受性プローブである DiBAC₄(3) は、脱分極された細胞に入った後、細胞内タンパク質または膜に結合して、強い蛍光を示す。脱分極の増大は、陰イオン性色素のさらなる流入および蛍光の増加を示す。以上より、脱分極をしていない生菌では弱い蛍光を示し、脱分極された死菌では強い蛍光を示したことが確認された¹³³⁾。

αCD、βCD、γCD および βCD 誘導体 (HPβCD、MβCD および TAβCD) は、生菌と

死菌で確認された中間に位置するところに蛍光強度の増強が確認された。よって、CD を添加したことで、大腸菌の細胞膜電位が乱れた可能性が推察された。なかでも、 β CD 誘導体において電位変化が顕著に確認されたことより、CD 誘導体の置換基の違いにより、細胞膜への影響が強化されたものと推察された¹³⁴⁾。

一方 HT 単独では、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度では顕著な電位変化は確認されなかった。また、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度では細胞膜電位のシフト (細胞膜の乱れ)¹³⁵⁾が観察された。これらの結果から、HT は用量依存的に細菌の膜電位に影響を与えることが推察された。しかしながら、確認された膜電位変化はわずかであったことから、HT が膜電位変化を及ぼすにはある一定の濃度以上の HT が必要であることが推察された。

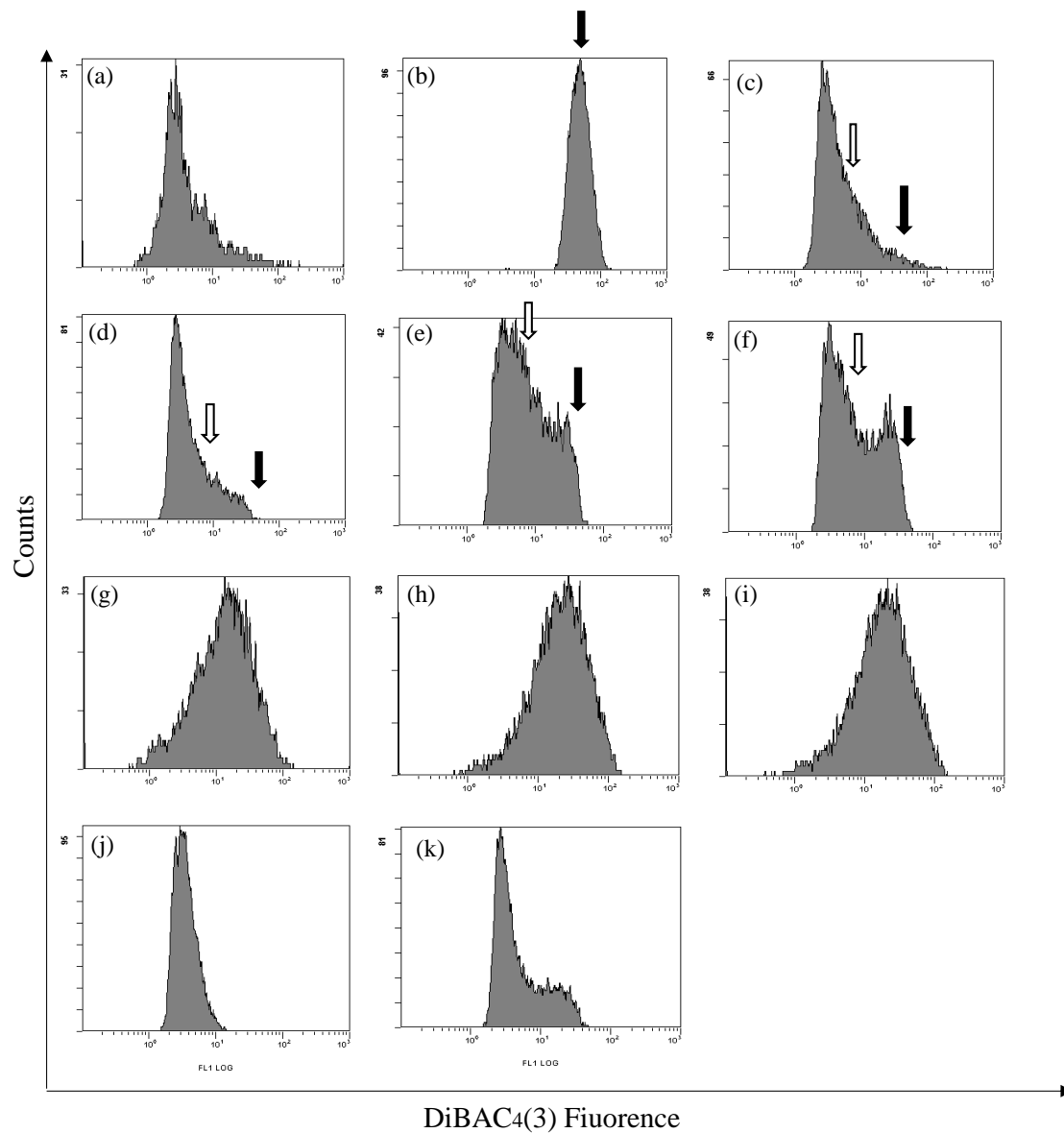


Fig. 54 Flow cytometric analysis of *E. coli* with HT and CDs.
 (a) control, (b) negative control, (c) positive control, (d) α CD, (e) β CD, (f) γ CD,
 (g) HP β CD intact, (h) M β CD intact, (i) TA β CD intact, (j) HT intact (20 μ g/mL),
 (k) HT intact (80 μ g/mL).

1-6 HT/CDs 複合体における細胞膜傷害性の評価

HT および CD における細菌の細胞膜への影響の有無を確認するために、LIVE/DEAD® *BacLight* Bacterial Viability Kits を用いて HT の細胞膜障害性の評価を行った^{136,137}。*BacLight* は、細胞膜透過性の異なる2つの核染色試薬 (SYTO9: 緑色 および PI: 赤色) により同時染色することで、生細胞 (膜損傷なし) および死細胞 (膜損傷あり) を見分けることができる。これらを利用して膜損傷の有・無で細菌の生・死判定を行うことができ、得られた結果より HT の膜障害性の有無を判定した。試験菌は、グラム陰性菌である大腸菌を用いた。

HT 単独は、HT の用量依存的に死菌数を示す赤色発光の増加が確認された (Fig.55)。特に、HT (320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度) において3時間値で死菌のみが確認され、生菌を示す緑色発光は観察されなかった。また、時間経過とともに生菌数が再度増加する傾向がみられなかったことから、HT は大腸菌に対して不可逆的な抗菌効果、つまり殺菌的な効果を示すことが考えられた。よって、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可能性が考えられた。

CD 単独を添加した結果、3、6 および 24 時間値においてほぼ control 同様の生菌が確認され、CD 単独では菌体膜 (物理的障壁) への傷害を示さなかった (Fig.56)。この結果から、CD 単独では細菌の細胞膜に影響を及ぼさないことが確認された。

PM (HT/ α CD=1/2) を添加した結果、HT 単独に類似した挙動が確認された (Fig.57)。PM では、HT と CD がそれぞれ単独で存在しているため、抗菌作用を有する HT の効果だけが示されたと推察した。一方、GM (HT/ α CD=1/2) を添加した結果、高濃度で24時間 HT を暴露した場合に生菌が多く観察された。これは、大腸菌が HT に暴露され溶菌した結果、核染色試薬で染色されず蛍光発光しないことから、死菌として観察されず、相対的に生菌が増加した可能性があるかと推察した。

GM (HT/ β CD=1/1) を添加した結果、全ての濃度において HT 単独と比較し、HT の

殺菌効果の遅延が確認された。 β CD で包接されることによる HT の放出抑制が起因している可能性が考えられた。

GM (HT/ γ CD=1/1) を添加した結果、低濃度 (HT:40 μ g/mL) において 3 時間値で約 61%の死菌が確認された。その後 24 時間値では、約 75%の死菌を示した。この結果から、GM (HT/ γ CD=1/1) では、速やかに HT の放出が起こり、抗菌作用を示していることが推察された。

GM (HT/TA β CD=1/1) の結果より、HT の殺菌効果とは異なる挙動が確認されたことから、TA β CD が大腸菌に対して何らかの作用を及ぼしている可能性が考えられた。TA β CD 単独で試験を行った結果、control 群とほぼ同様の結果が得られた。このことから、TA β CD を用いて複合体を形成することで、殺菌的な効果はないが、菌の状態変化を起こす可能性が考えられた。よって、他の CD を用いた包接体と一部異なる挙動を示したものと考えられた。

以上の結果より、HT は CD で包接されることにより、HT/CD 複合体の細胞膜へのアプローチが引き金になり、障壁となる菌体膜への HT の透過性が促進^{138, 139)}され、HT の抗菌活性の向上が得られた可能性が考えられた。特に、低濃度の HT 含量において、HT 単独とは異なる挙動を示したことから、包接体を形成することで、効率的に HT の抗菌作用を示した可能性が考えられた。HT/CDs 複合体において、それぞれの CD 間での HT の抗菌作用の程度に違いがみられたのは、CD で包接されることによる HT の構造的安定性が寄与していると考えられた。第 1 章において、それぞれの HT/CDs 複合体の物性評価により、用いる CD によって異なる包接様式をとることが確認されている。このことより、CD 内の HT 分子の状態変化が起こり、細菌に対する効力の違いに反映された可能性がある。

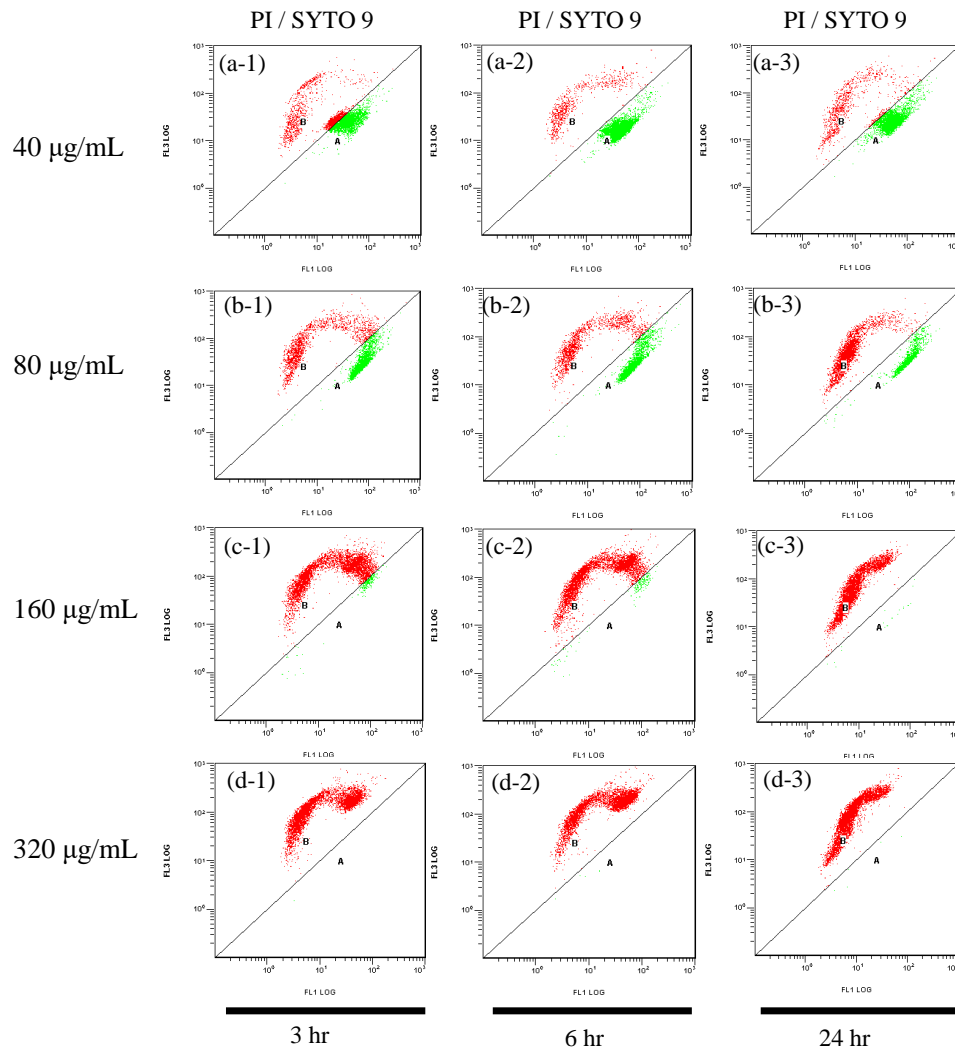


Fig.55 Flow cytometric analysis of *E. coli* with HT intact.
 (a) HT 40 $\mu\text{g/mL}$, (b) HT 80 $\mu\text{g/mL}$, (c) HT 160 $\mu\text{g/mL}$, (d) HT 320 $\mu\text{g/mL}$.

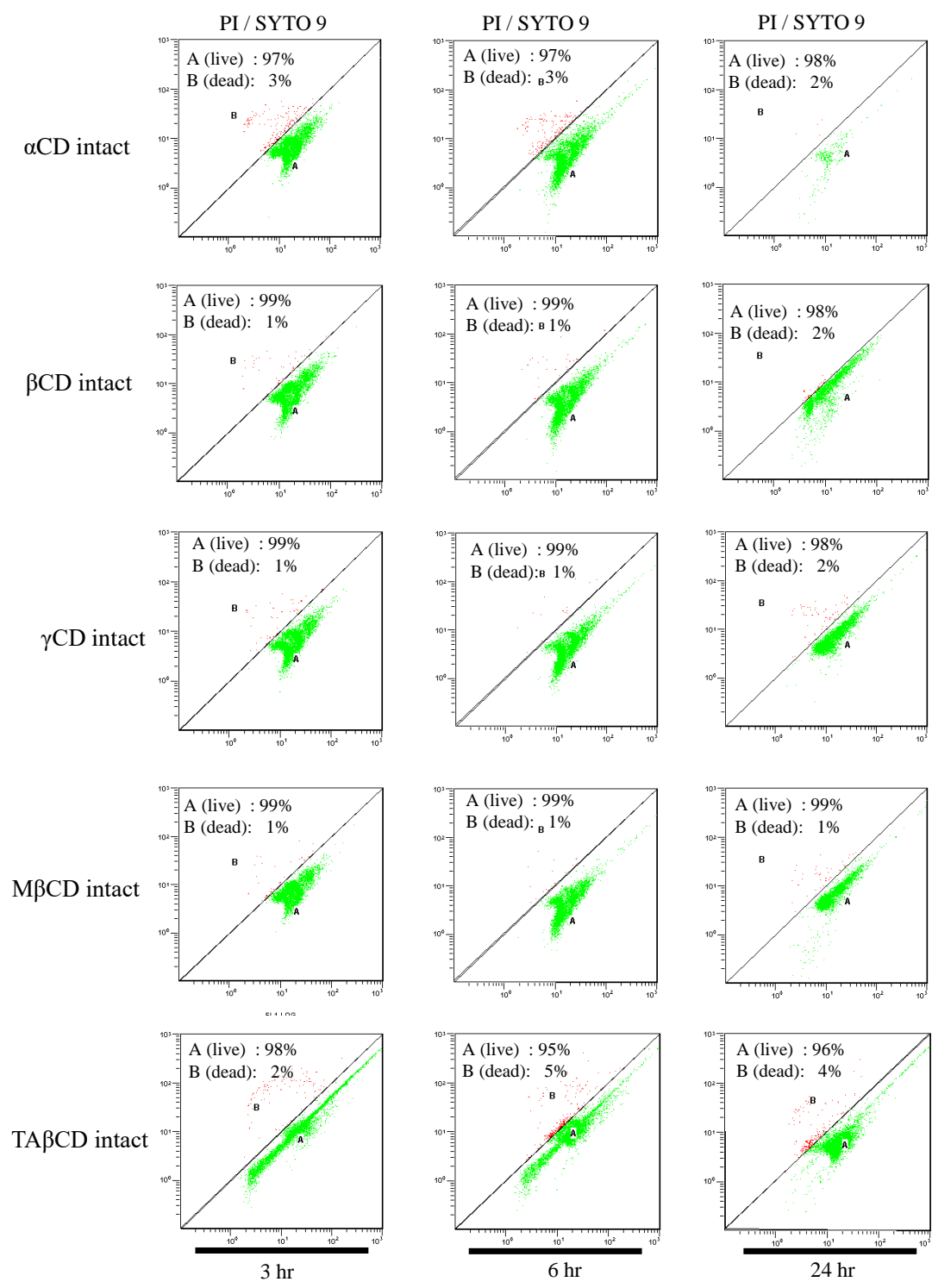


Fig. 56 Flow cytometric analysis of *E. coli* with CDs.

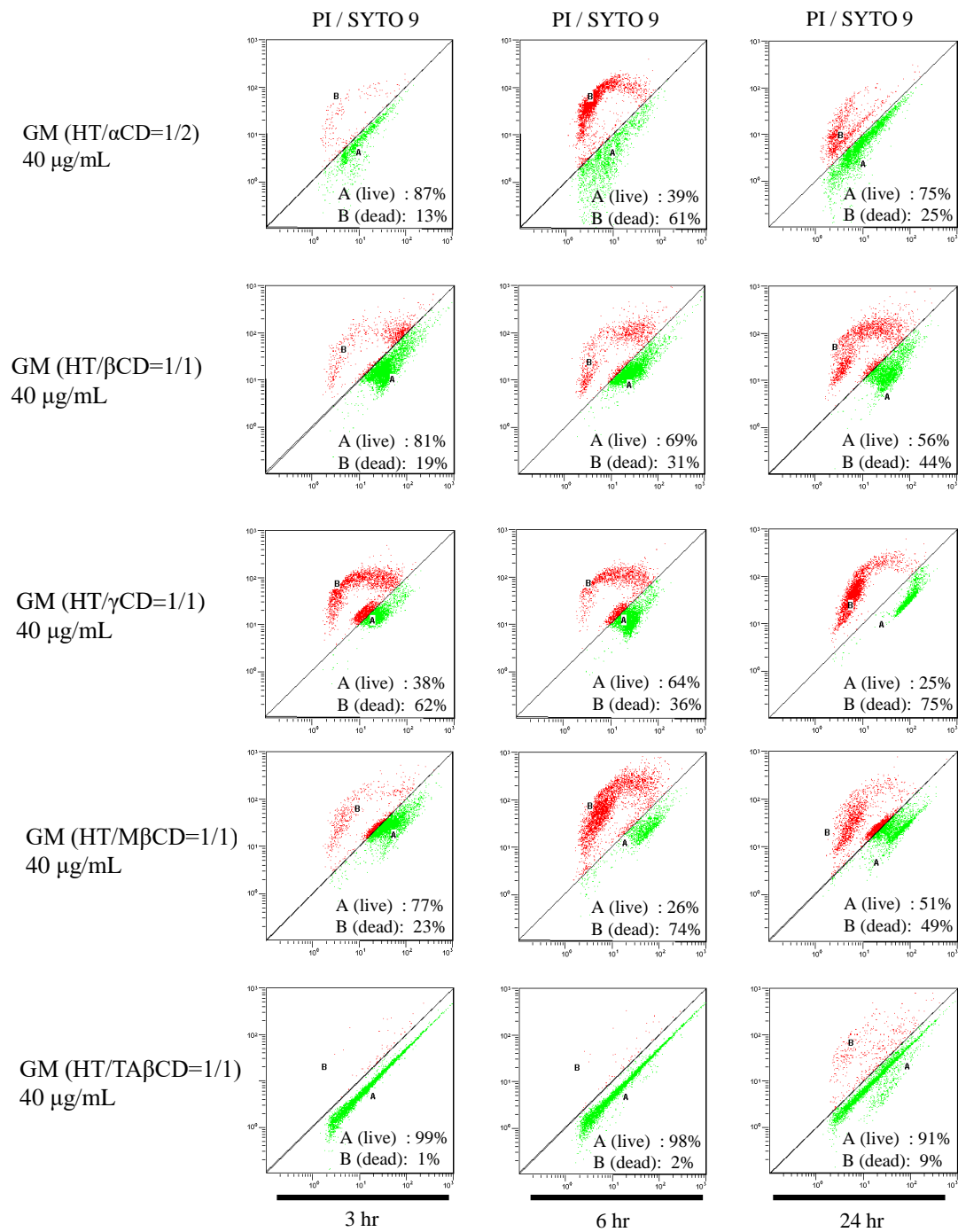


Fig. 57 Flow cytometric analysis of *E. coli* with GMs.

第1節 小括

第1節において、HT および HT/CDs 複合体が細菌（枯草菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌および緑膿菌）に対して活性を示すことが明らかとなった。HT 単独の MIC は枯草菌（80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、黄色ブドウ球菌（160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、大腸菌（80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）および緑膿菌（320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を示した。一方、各 GM は、枯草菌（20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、黄色ブドウ球菌（40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）および大腸菌（20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の MIC 値を示し、HT 単独と比較して約 4 分の 1 の濃度で効果を示すことが確認された。また、各 GM の MIC は、緑膿菌（160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を示し、HT 単独と比較して約 2 分の 1 の濃度で効果を示すことが確認された。よって、HT/CDs 複合体を形成することで、HT の抗菌活性の向上を示すことが明らかとなった。

Time-kill assay の結果より、HT/CDs 複合体は HT 単独と比較し、短時間で殺菌作用を示した。包接複合体を形成することで、水溶液中での HT の安定性が保たれたことで、24 時間値まで継続的に HT の抗菌作用を示したことが推察された。

細胞膜電位試験および細胞膜傷害性試験の結果より、HT の抗菌活性は、細菌の細胞膜に対して傷害を与えることによるものと予想された。CD 単独では、細菌の細胞膜傷害を示さなかった。一方、各 GM では、低濃度の HT 含量において、短期的に死菌数を増加させるといった HT 単独とは異なる挙動を示した。HT の抗菌作用は、算出した MIC 値より、CD で包接されることでより高い活性を示すことが確認されている。そのメカニズムとして、HT を CD で包接することにより HT 周辺の親水性が疑似的に増すことで、細菌表面に効率よく HT が到達することを可能とし、低濃度の HT で高い活性を示したことが推察された。

今回用いた細菌は、常在菌として存在し日常生活で問題となる菌であり、それぞれの細菌に対して HT が少量で抗菌作用を示し、日常生活における除菌剤（手指消毒薬、除菌スプレーなど）として有用であることが予想された。よって、天然抗菌成分としての HT の利用拡大が期待される。

第 2 節 HT/CDs 複合体における抗真菌活性の評価

一般的に精油成分は、抗真菌作用を示すことが知られている。精油の作用メカニズムとしては、細胞膜への作用、ミトコンドリアの膜機能阻害などが知られている。同様に HT は、抗菌作用だけでなく抗真菌作用を示すことが知られている^{140, 141)}。細菌において確認された HT の抗菌活性の影響は CD との複合体形成が寄与しているものと考えられた。これまでに、抗細菌成分だけでなく CD で抗真菌成分を包接した場合、抗真菌作用への影響を及ぼすことが報告されている^{142, 143)}。そこで、HT/CDs 複合体の真菌に対する活性への影響を評価した。

2-1 HT の真菌に対する効果の評価

HT の真菌に対する活性を評価するために、寒天希釈法を用いて MIC 値を算出して評価を行った (Table 2)。試験菌は、生活環境で問題となる酵母菌として *Candida albicans* (*C. albicans*) および糸状菌として *Aspergillus brasiliensis* (*A. brasiliensis*) の 2 種を選択した。

HT 単独の MIC は *C. albicans* (20 µg/mL) および *A. brasiliensis* (20 µg/mL) を示した。HT 単独粉末物は、HT 結晶と同様の MIC を示した。

HT の *C. albicans* に対する MIC は既に報告されており、本研究で算出された MIC と大きく異なることはなかった。精油成分は真菌に対して、真菌の菌糸に作用するといわれている。そして、細胞壁の剛性および完全性の喪失、細胞死をもたらす細胞質成分の喪失が引き起こされることが知られている¹⁴⁴⁾。

C. albicans は、ヒトの口腔、消化管、膺、皮膚などに常在する真菌である。ストレスあるいは免疫抑制、化学療法などにより宿主の抵抗力が低下した場合、日和見感染を起こすことが知られている¹⁴⁵⁾。*A. brasiliensis* は、世界各地の土壌、空中、穀物をはじめとする食品など生活環境から高頻度に分離され *Penicillium* 属と並んで最も普遍的な真菌のひとつである。*A. brasiliensis* は、ヒト、動物に日和見感染を引き起こすことが知られている。*Aspergillus* 属のなかには、*A. brasiliensis* だけでなく *Aspergillus fumigatus* などがアレルギー性気管支肺真菌症 (allergic broncho-pulmonary mycosis: ABPM) の原因となるなど医療上問題となっている¹⁴⁶⁾。HT 単独は 2 種の真菌に対して抗真菌活性を示したことから、院内感染対策としての HT の利用が期待できる。

2-2 HT/CDs 複合体の真菌に対する効果の評価

HT/CDs 複合体における HT の真菌に対する活性を評価するために、寒天希釈法を用いて MIC 値を算出した (Table 2)。

PM (HT/ α CD=1/2)、PM (HT/ β CD=1/1)、PM (HT/ γ CD=1/1)、PM (HT/HP β CD=1/1)、PM (HT/TA β CD=1/1) および PM (HT/HP γ CD=1/1) は、*C. albicans* (20 μ g/mL) および *A. brasiliensis* (20 μ g/mL) を示した。PM (HT/M β CD=1/1) では、*C. albicans* (10 μ g/mL) および *A. brasiliensis* (10 μ g/mL) を示した。一方、GM (HT/ α CD=1/2) 、GM (HT/ β CD=1/1)、GM (HT/ γ CD=1/1)、GM (HT/HP β CD=1/1)、GM (HT/M β CD=1/1) および GM (HT/HP γ CD=1/1) は、*C. albicans* (10 μ g/mL) および *A. brasiliensis* (10 μ g/mL) を示した。GM (HT/TA β CD=1/1) では、*C. albicans* (20 μ g/mL) および *A. brasiliensis* (40 μ g/mL) を示した。

抗真菌試験の結果、HT 単独と比較して GM において MIC 値が低値を示したことから、*C. albicans* および *A. brasiliensis* に対する HT の抗真菌活性が向上したものと考えられた。しかしながら、細菌を用いた抗菌試験の結果ほど MIC 値の低下は見られなかった¹⁴⁷⁻¹⁵¹。このことは、HT の細菌および真菌に対する作用機序の違い、もしくは細菌と真菌の構造の違いによる CD の効果の違いが影響している可能性が考えられた。

一般的に、精油成分は細菌よりも真菌に強い活性を示すことが報告されている。これは、細胞壁構造の違いが起因していると考えられている。もしくは、真菌のミトコンドリア機能を傷害し、酸化ストレスを誘発させることで抗真菌作用を示すことが知られている。そのため、細菌にはミトコンドリアがなく、呼吸機能は細胞膜に存在するため、異なる阻害作用を示したことが予想される。また、精油は、真菌のエルゴステロールの合成阻害作用があることが知られている。エルゴステロールは、細胞膜の安定化などの機能を持ち、細菌には存在しない。そのため、HT を添加したことにより、真菌のエルゴ

ステロールの減少が生じ、細胞膜機能の低下が起きたことで抗真菌作用を示したことが推察された。

以上の細菌および真菌への HT の作用機序の違いが、HT/CDs 複合体を形成した際に、HT の活性が維持されることは、複合体に用いた CDs 誘導体の特性の違いにより、活性の程度に影響したものと推察した。

Table 2 Antifungal activity of HT/CDs systems.

Samples	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	<i>C.albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
CDs	n.d.	n.d.
HT intact	20	20
HT ground	20	20
PM (HT/ α CD=1/2)	20	20
PM (HT/ β CD=1/1)	20	20
PM (HT/ γ CD=1/1)	20	20
PM (HT/HP β CD=1/1)	20	20
PM (HT/M β CD=1/1)	10	10
PM (HT/TA β CD=1/1)	20	20
PM (HT/HP γ CD=1/1)	20	20
GM (HT/ α CD=1/2)	10	10
GM (HT/ β CD=1/1)	10	10
GM (HT/ γ CD=1/1)	10	10
GM (HT/HP β CD=1/1)	10	10
GM (HT/M β CD=1/1)	10	10
GM (HT/TA β CD=1/1)	20	40
GM (HT/HP γ CD=1/1)	10	10

C.alb : *Candida albicans*, *A.bra* : *Aspergillus brasiliensis*

All MIC values are converted to HT concentration.

n.d.: not determined.

第 2 節 小括

第 2 節では、HT および HT/CDs 複合体の *C. albicans* および *A. brasiliensis* に対する抗真菌活性を示すことが明らかとなった。HT/CDs 複合体では、HT 単独と比較して MIC 値の低下が確認された。よって、HT/CDs 複合体は、MIC 値が低下したことから抗菌活性の向上に寄与したことが確認された。今回用いた 2 種の真菌は、日和見感染で問題となる。また、真菌のなかでも抵抗性を示すものとして、糸状菌が存在する。消毒薬のなかでも、低水準性消毒薬などでは、糸状菌が抵抗性を示すことで十分な効果が得られないことがある。よって、これらの真菌に対して活性を示す HT/CDs 複合体は、臨床現場での応用が期待できる。

第3節 HT/ γ CD 複合体の皮膚刺激性評価

現在、感染症防止法の手段の一つとして、簡便に消毒を行うことができるため、アルコール手指消毒薬が臨床現場で汎用されている。しかしながら、アルコール手指消毒薬の頻回使用による手荒れが問題視されている背景もある。手荒れは、手指消毒のコンプライアンス低下を招き、手荒れを起こした部位は、細菌の定着部位にもなりうる。

HT は、すでに化粧品分野などで使用されており、皮膚に対して刺激を起こさないことが知られている。しかしながら、CD との複合体の皮膚刺激性については十分に評価されていないため、HT/ γ CD 複合体として安全に使用できるかを検討する必要がある。そこで、HT および HT/ γ CD 複合体の皮膚への影響を確認するために、ヘアレスマウス皮膚に複合体を適応した後の皮膚組織像を観察し、皮膚刺激性を評価した (Fig.58)。

HT 水溶液および GM (HT/ γ CD=1/1) 水溶液の 2 群にて試験を実施した。通常、皮膚刺激性試験で注目する初期変化は、表皮の肥厚および表皮直下の真皮への細胞浸潤である¹⁵²⁾。刺激が強い場合は、表皮から真皮での変性・壊死ならびに水腫もみられることがある。しかしながら、本結果においてはそのような明らかな皮膚状態の変化は確認されなかった (Table 3)。また、試験液を塗布していない部位と比較しても、皮膚の状態変化は確認されなかった。よって、HT および GM (HT/ γ CD=1/1) は皮膚に対する刺激性は示さないことが確認された。

手指衛生における皮膚反応性は、継続して使用する上で重要な指標となる。実際、手指衛生としてアルコール性手指消毒薬を使用している場合、乾燥、刺激、かゆみなどの症状を示すことが報告されている。これらの症状は、手指衛生におけるコンプライアンス低下につながり、手指衛生の徹底がされない場合、ヒトを介した微生物の蔓延を引き起こすことが予想される。よって、HT において皮膚反応性が確認されなかったことは、手指消毒薬として継続して使用することを可能とする結果であった。

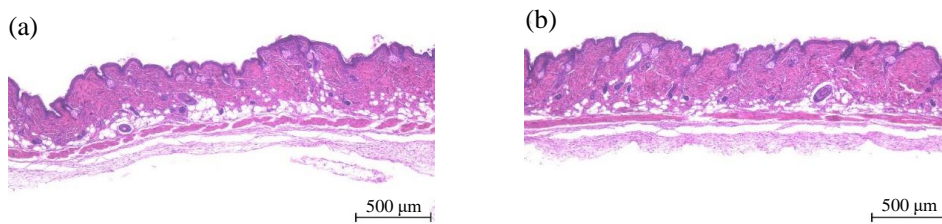


Fig. 58 HE staining showing histological change of mouse skin after HT application.
 (a) HT intact, (b) GM (HT/ γ CD=1/1).

Table 3 Skin irritation test.

Samples	HT intact				GM (HT/ γ CD=1/1)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
皮膚	-	-	-	-	-	-	-	-
表皮肥厚	-	-	-	-	-	-	-	-
炎症性細胞浸潤	-	-	-	-	-	-	-	-
水腫	-	-	-	-	-	-	-	-
変性・壊死	-	-	-	-	-	-	-	-

程度：-変化なし、±ごく軽度、+軽度、++中等度、+++高度

第3節 小括

HT は、メラニン生成抑制作用もあることから化粧品などに配合されており、皮膚適用としてすでに使用されている。今回得られた結果より、皮膚刺激性はなく、HT は安全にヒトに対して使用できることが明らかとなった。また、GM (HT/ γ CD=1/1) も同様に皮膚刺激性がないことが明らかとなった。これより、HT/CD 複合体の外用剤における安全性が示された。

第 2 章 総括

第 2 章では、HT および HT/CDs 複合体が細菌および真菌に対して活性を示すことが明らかとなった。HT は微生物に対して、短時間で不可逆的な増殖抑制を示すことが確認された。HT/CDs 複合体において、用いる CD によって HT の抗菌活性を持続させることが可能となることが明らかとなった。また、真菌のなかでも抵抗性を示すものとして、糸状菌が存在する。消毒薬のなかでも、低水準性消毒薬などでは、糸状菌が抵抗性を示すことで十分な効果が得られないことがある。HT が糸状菌である *A. brasiliensis* に対しても低濃度で効果を示したことは、効率的に生活環境の除菌を可能とすることが期待できる。

また、HT および HT/CDs 複合体は、皮膚刺激性がないことが示された。これより、より多くのヒトに対して使用することのできる抗菌成分として応用の幅を広げることができる。以上の結果から、臨床現場での手指消毒目的としての HT/CDs 複合体の利用が期待できる。

第3章 HT/CDs 複合体を用いた製剤応用の検討

第3章 序

現在、臨床現場では簡便に除菌が可能で液垂れのないハンドジェルタイプの半固形製剤が汎用されている。ゲル化には、増粘多糖類が用いられており、海藻、植物由来の天然多糖類として、カラギーナン、ペクチンおよびグアーガムなどが知られている¹⁵³⁾。これまでに Inoue らは、ゼラチン (Gel)、キサントタンガム (Xan) および κ , λ , ι -カラギーナン (κ , λ , ι -Car) を用いたゲル化製剤は各基剤によってゲルの硬さや脆さが異なるため、それぞれの基剤の特徴に合わせた使用方法の選択が必要であると報告している¹⁵⁴⁾。増粘剤は粘性や接着性を付けるために嚥下困難者に対する流動食品や一般食品、化粧品および医薬品などに用いられている。

微生物である *Xanthomonas campestris* 由来の天然高分子多糖類であるキサントタンガムは、乳液や化粧水に使われている。キサントタンガムは、グルコースの主鎖にマンノースおよびグルクロン酸からなる側鎖が付いた構造である。キサントタンガムは、冷水および温水に可溶であり、耐熱性・耐酸性・耐塩性・冷凍解凍耐性があり、様々な条件に対応できる性質を持っているため、多くの製品開発に利用されている¹⁵⁵⁾。

カラギーナンは、紅藻類から得られる陰イオン性多糖類であり、それぞれ特徴が異なるタイプが存在する。 κ -Car は苦みのマスキングのために医薬品の添加剤として利用されている。 λ -Car はドレッシングやソースなどに、 ι -Car はゼリーやミルクプリンなどに使用されている。このように増粘剤は日常生活において非常に汎用であり、また、安全性の確立も高い添加物である¹⁵⁶⁾。

これまでの、第1章および第2章において、HT/CD 包接複体の形成および HT の溶出性・抗菌性の向上が確認された。そのため、新規抗菌製剤としての

HT/CD 包接複合体の臨床応用を想定した製剤応用を試みることにした。そこで第3章では、HT/ γ CD 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、抗菌能を応用したゲル化製剤の開発を目指した製剤応用を試みた。

第1節 HT/ γ CD 複合体を用いたゲル化製剤の調製

1-1 調製したゲル化製剤の妥当性の評価

調製したゲル化製剤の外観を評価するために、各ゲル化製剤を目視にて観察した (Fig. 59)。全てのゲル化製剤において離水は確認されず、むらのない澄明なゲルであることが観察された。

調製したゲルにおける HT の分散性を確認するために蛍光顕微鏡にて観察を行った (Fig. 60)。HT は蛍光発光を示し、HT の励起波長は 490 nm であると報告されている。494 nm の波長を照射して観察したところ、HT 結晶は青色に蛍光発光することが確認された。全てのゲル化製剤において、一面が青色に発光し HT の存在が確認された。また、均一な HT 由来の蛍光発光が確認されたことより、ゲル中に HT が均一に分散していることが確認された。

一般的に、カラギーナンは 40-45°C でゲル化することが知られており¹⁵⁷⁾、このような性質からカラギーナンを用いたゲル化製剤は、室温においても分散性が良く均一な調製が可能であることが示された。また、キサンタンガムは水和速度が速く、調製時に表面のみが溶解し、内部は粉末状態で残存することにより、凝集体ができやすいことが知られている¹⁵⁸⁾。今回の調製法において、調製したゲル状態は均一であり、凝集体も確認されず、高い再現性を示すことが確認された。よって、ゲル化基材を十分水和させるための攪拌時間は確保されており、ゲル化製剤の調製方法は妥当であることが示された。

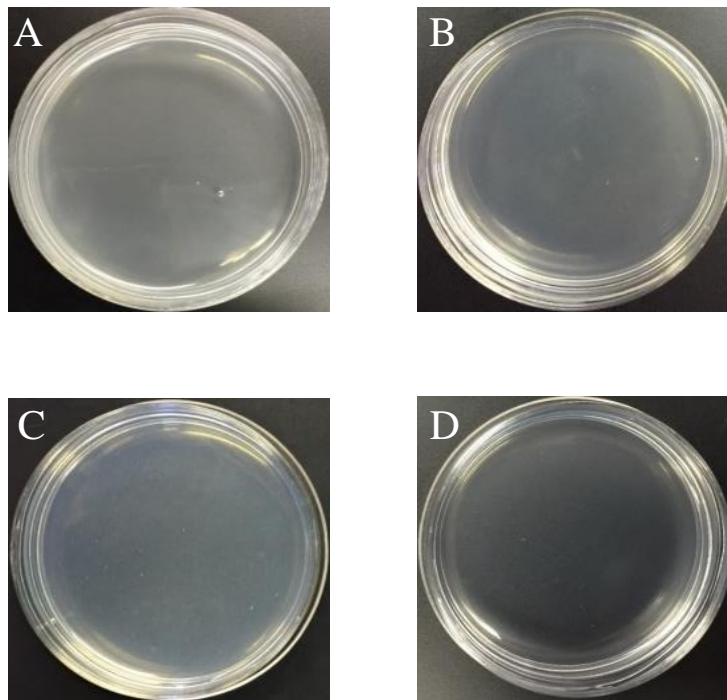


Fig. 59 Appearance of gel formulations.

A: HT/γCD-Xan, B: HT/γCD-κ-Car, C: HT/γCD-λ-Car, D: HT/γCD-ι-Car.

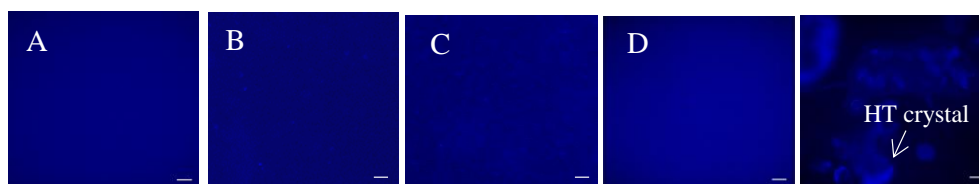


Fig. 60 Fluorescence microscope of HT unprocessed and gel formulations.

A: HT/γCD-Xan, B: HT/γCD-κ-Car, C: HT/γCD-λ-Car, D: HT/γCD-ι-Car.

Scale bars indicate 100 μm.

第2節 HT/ γ CD 複合体ゲル化製剤の物理化学的性質の評価

2-1 粘度測定

応力負荷をかけたときの製剤の伸びを検討し、各ゲル化製剤の基剤の濃度を決定するために 25 °C での粘度測定を行った¹⁵⁹⁾ (Table 4)。指標とする市販の抗菌ハンドゲルであるエタプラス[®]ゲル (EP) の粘度は、0.82 Pa·s を示した。HT/ γ CD-Xan1.25%、1.5%および 1.75%では、0.69、0.93 および 1.44 Pa·s、HT/ γ CD- κ -Car0.5%、0.75%および 1.0%では、0.04、0.14 および 0.80 Pa·s、HT/ γ CD- λ -Car1.25%、1.5%および 1.75%では、0.23、0.51 および 1.12 Pa·s、HT/ γ CD- ι -Car0.5%、0.75%および 1.0%では、0.07、0.37 および 1.16 Pa·s を示した。

粘度測定の結果、各増粘剤で濃度依存的に粘度が上昇することが確認された。Xan では 1.5%、 κ -Car では 1.0%、 λ -Car では 1.75%および ι -Car では 1.0%の濃度において EP と最も近い粘度を示した。これらの濃度で調製したゲル化製剤は、手指消毒薬として市販されている製剤と同等の粘度であることが示された¹⁶⁰⁾。よって、この後の実験は、Xan:1.5%、 κ -Car:1.0%、 λ -Car:1.75%および ι -Car:1.0%の濃度を用いて、HT/ γ CD ゲル化製剤の検討を行った。

Table 4 Viscosity of HT/ γ CD gels at 25 °C.

Formulation	Percentage of gel (w/v%)	Viscosity (Pa · s) means \pm S.D.
EP	-	0.82 \pm 0.04
	1.25	0.69 \pm 0.01
HT/ γ CD-Xan	1.5	0.93 \pm 0.02
	1.75	1.44 \pm 0.23
	0.5	0.04 \pm 0.01
HT/ γ CD- κ -Car	0.75	0.14 \pm 0.02
	1.0	0.80 \pm 0.04
	1.25	0.23 \pm 0.02
HT/ γ CD- λ -Car	1.5	0.51 \pm 0.10
	1.75	1.12 \pm 0.29
	0.5	0.07 \pm 0.01
HT/ γ CD- ι -Car	0.75	0.37 \pm 0.01
	1.0	1.16 \pm 0.01

Results were expressed as mean \pm S.D. (n=4).

2-2 粘弾性測定

粘度測定の結果を用いて、HT/ γ CD-Xan1.5%、HT/ γ CD- κ -Car1.0%、HT/ γ CD- λ -Car1.75%およびHT/ γ CD-t-Car1.0%で調製した、ゲル化製剤の応力に対する挙動を確認するために粘弾性測定を行った (Fig. 61)。HT/ γ CD- κ -Car1.0%およびHT/ γ CD- λ -Car1.75%において、剪断速度を上昇させた時と降下させた時では異なる挙動を示す、ヒステリシスカーブが確認された。一方、HT/ γ CD-Xan1.5%、HT/ γ CD-t-Car1.0%およびEPでは、類似した挙動を示し、剪断速度を変化させてもフローカーブ面積が狭く、剪断速度を上昇させた時と降下させた時は同じ挙動を示すことが確認された。

粘弾性測定では、HT/ γ CD- κ -Car1.0%およびHT/ γ CD- λ -Car1.75%においてヒステリシスカーブが確認された。ヒステリシスカーブを示す要因として、内部構造の回復に時間を要することが起因している¹⁶¹⁾。よって、応力を加えることによりゲル構造が崩壊したため、剪断速度上昇時と降下時で異なる挙動を示したと推察された。一方、HT/ γ CD-Xan1.5%、HT/ γ CD-t-Car1.0%およびEPでは、類似した挙動を示し、フローカーブ面積が狭いことが確認された。フローカーブ面積は内部構造の強さを示している¹⁶²⁾。これは剪断速度の変化にゲルが順応し、ゲルの崩壊を示さず、柔軟性が良いゲルであることが推察された。ゲルの粘弾性は、ポンプ式手指消毒剤の使用時に反映され、ポンプから押し出した際にゲルの構造が壊れにくいものが有用であると考えられる¹⁴⁷⁾。以上より、HT/ γ CD- κ -Car1.0%およびHT/ γ CD- λ -Car1.75%はゲル構造の崩壊が起こることが予測され、ポンプから押し上げて使用すると粘度が低下しハンドゲルとしての機能が失われると推察された。一方、HT/ γ CD-Xan1.5%およびHT/ γ CD-t-Car1.0%の粘弾性は、EPと比較して類似した挙動を示したことから、ゲルの柔軟性が良く、ポンプ押し出しによるゲルの崩壊が少ないと考えられた。

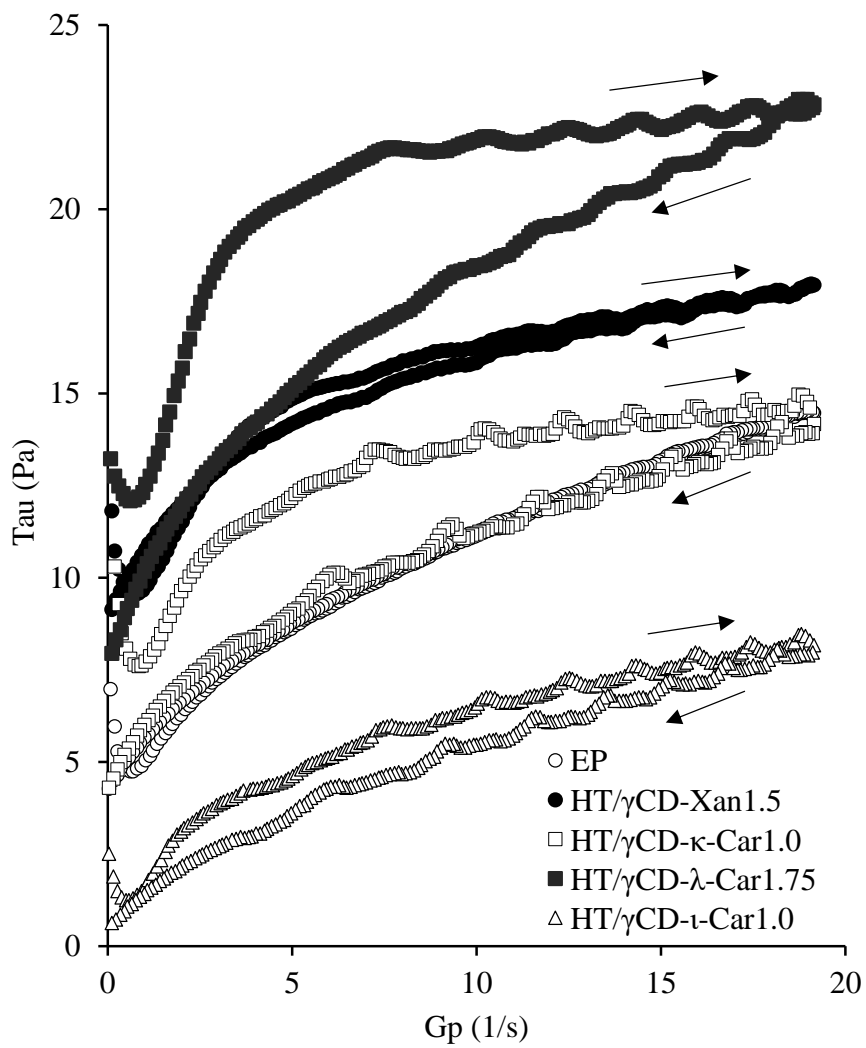


Fig. 61 Shear stress versus shear speed curves of HT/ γ CD gels at 25 °C.

2-3 pH測定

皮膚への適応性を評価するために、各基剤および各ゲル化製剤の pH 測定を行った (Table 5)。EP の pH は、6.51 を示した。Xan 単独、HT/ γ CD-Xan の pH は 5.21、5.18、 κ -Car 単独、HT/ γ CD- κ -Car は 8.75、6.49、 λ -Car 単独、HT/ γ CD- λ -Car は 8.89、8.55、および ι -Car 単独、HT/ γ CD- ι -Car は 8.15、5.78 を示した。

pH 測定の結果、HT/ γ CD-Xan および HT/ γ CD- ι -Car の pH は弱酸性を示した。黄色ブドウ球菌などの細菌は皮膚の pH が中性で活性化することが報告されている¹⁶³⁾。弱酸性である HT/ γ CD-Xan および HT/ γ CD- ι -Car では細菌の活性化を防ぐことが可能となる。また、皮膚への刺激性が低いため製剤としての応用が可能であることが推察された。

Table 5 Measurement of pH value of HT/ γ CD gels.

Formulation	pH (means \pm S.D.)
EP	6.51 \pm 0.07
Xan	5.21 \pm 0.00
HT/ γ CD-Xan	5.18 \pm 0.03
κ -Car	8.75 \pm 0.10
HT/ γ CD- κ -Car	6.49 \pm 0.23
λ -Car	8.89 \pm 0.14
HT/ γ CD- λ -Car	8.55 \pm 0.09
ι -Car	8.15 \pm 0.16
HT/ γ CD- ι -Car	5.78 \pm 0.03

pH value of distilled water : 6.02 \pm 0.15

Results were expressed as mean \pm S.D. (n=4).

2-4 展延性測定および降伏値の算出

各ゲル化製剤の展延性を検討するために、スプレッドメーターを用いて展延性測定を行った (Fig. 62)。ゲルの拡がり安定した360秒での直径はEP、HT/ γ CD-Xan1.5%、HT/ γ CD- κ -Car1.0%、HT/ γ CD- λ -Car1.75%およびHT/ γ CD- ι -Car1.0%において、7.04、6.03、4.14、4.18 および 6.27 cm を示した。展延性測定の結果より降伏値を算出したところ EP、HT/ γ CD-Xan1.5%、HT/ γ CD- κ -Car1.0%、HT/ γ CD- λ -Car1.75% および HT/ γ CD- ι -Car1.0%において、16.4、35.1、215.5、228.0 および 24.4 dyne/cm²となった。

展延性測定による降伏値の算出結果は粘性測定と相関する¹⁶⁴⁾。構造が壊れにくく柔軟性を有するゲルは、HT/ γ CD-Xan1.5%およびHT/ γ CD- ι -Car1.0%であり、またそれらの速度式の傾き、直径は大きくなり降伏値は低値となった。一方、ゲルが崩壊しやすいHT/ γ CD- κ -Car1.0%およびHT/ γ CD- λ -Car1.75%ではガラス板の重みでゲル能が低下し延びが悪くなり、他の2剤と比較し速度式の傾き、直径が小さくなり降伏値は有意に高値となった。これらは使用感に反映し、HT/ γ CD- κ -Car1.0%およびHT/ γ CD- λ -Car1.75%では使用した際、手の上での拡がり悪いことが推察される。一方、HT/ γ CD-Xan1.5%およびHT/ γ CD- ι -Car1.0%では、延びが良いため少量で手の上に薄く拡げることが可能となり、製剤として有用であることが推察された。

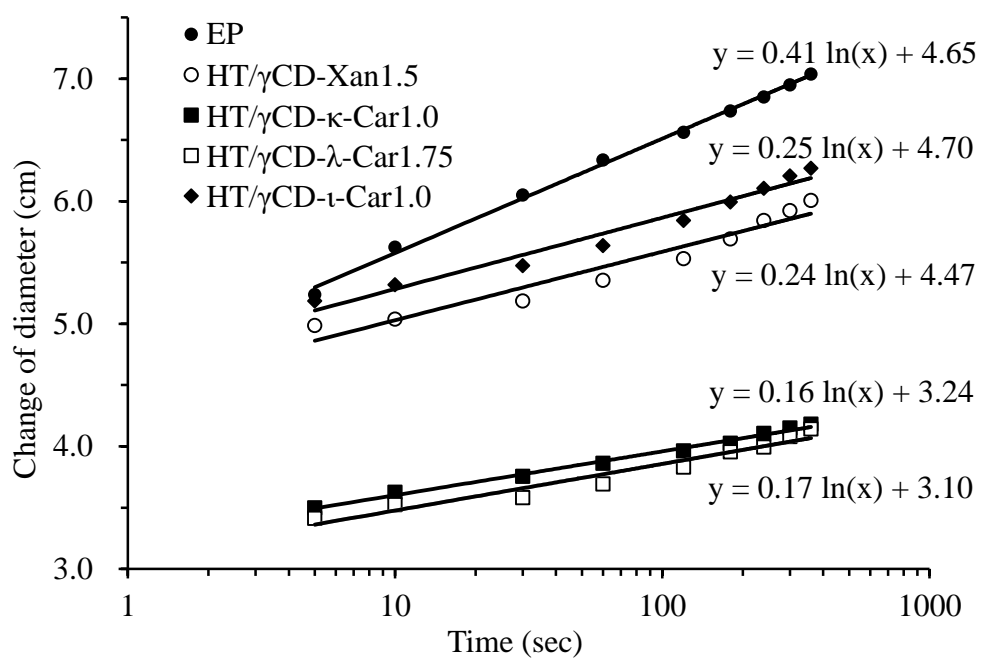


Fig. 62 Spreadability of HT/γCD gels at 25 °C (n=4).

2-5 放出試験

皮膚適用を目的とする際、含有薬物がどのように皮膚に浸透するかを知ることは製剤設計上重要である。しかしながら、日本薬局方における皮膚に対する薬物の放出性を評価する方法は規定がない。そこで、各ゲル化製剤の HT の放出特性を確認するために、溶出試験器を用いた放出試験を行った (Fig. 63)。そして、得られたゲルからの放出挙動より皮膚への浸透性を予測した。

GM (HT/ γ CD = 1/1) の HT の放出率は 5 分後に 80 %を示し、15 分後ではおよそ 100 %の放出率が得られた。HT/ γ CD- κ -Car1.0 %、HT/ γ CD- ι -Car1.0 %は GM と類似した放出挙動を示し、5 分後の HT の放出率が速やかなことが確認された。HT/ γ CD-Xan1.5%、HT/ γ CD- λ -Car1.75%は HT の放出が緩やかで、45 分後の HT の放出率はおよそ 60 %であった。

放出試験の結果より、HT/ γ CD- κ -Car1.0%、HT/ γ CD- ι -Car1.0%では、パドルの回転によりゲル構造が破壊し、そこへ水が浸入したために HT の溶出が速くなったと考えられた。カラギーナンは、温度依存的に二重螺旋構造が会合し三重螺旋構造を形成する¹⁶⁵⁾。また、カラギーナンは親水性である硫酸基を含む水溶性多糖類であるため、ゲル構造の崩壊が促進され放出率が速くなったと推察された。HT/ γ CD-Xan1.5 %ではキサンタンガムの擬塑性を有する特徴が影響したためと考えられた¹⁶⁶⁾。キサンタンガムは、三次元構造に似た網目構造を有しており、網目中に HT が絡まっていることが考えられる。また、パドルの回転により一度構造が破壊されるが結着性が強いために素早く回復し、HT の放出が抑制されたと推察された。HT/ γ CD- λ -Car1.75%では濃度依存的なゲルの構造変化が影響していると考えられ、硫酸基を多く持つものほど保水能が上昇するため¹⁶⁷⁾放出率が抑制されたと推察された。

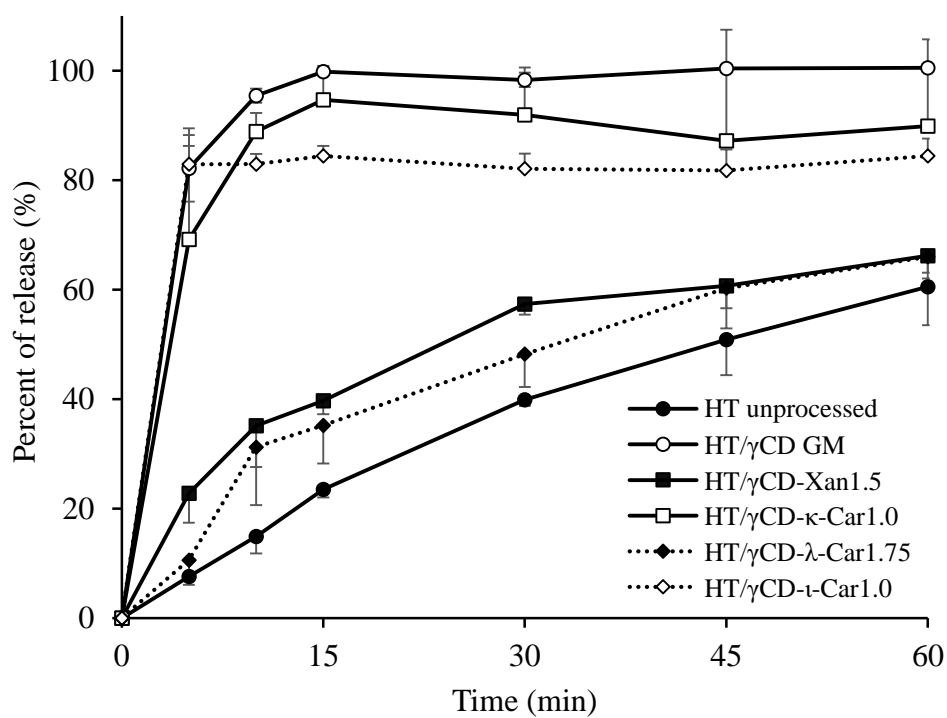


Fig. 63 Release profiles of HT/γCD gels. Results were expressed as mean \pm S.D. (n=3).

第3節 HT/ γ CD 複合体ゲル化製剤の安定性の評価

各ゲル化製剤中の HT の安定性を確認するために安定性試験を行った (Fig. 64)。全てのゲル化製剤は、14 日後まで目視で確認できる外観的变化はなかった。ゲル化製剤中の HT の残存率を算出したところ、HT/ γ CD-Xan1.5%の HT の残存率は、5 日後で 87 %、14 日後で 79 %を示し、他の製剤と比較して HT の安定性が保たれていることが示された。一方で、HT/ γ CD- λ -Car1.75%、HT/ γ CD- κ -Car1.0%および HT/ γ CD-i-Car1.0%では 3 日後で HT の残存率は 50 %以下となり、HT/ γ CD-Xan1.5%と比較して HT の安定性が低いことが明らかとなった。

安定性試験の結果より、カラギーナンを基剤とする製剤ではカラギーナンが持つ硫酸基により水分を保つ¹⁶⁸⁾ことで安定性が低下したと考えられた。一方、HT/ γ CD-Xan1.5%ではキサントガムの結着性が強い¹⁶⁹⁾特徴により HT がキサントガムの網目構造中に絡まったために HT の安定性が保たれたと推察された。

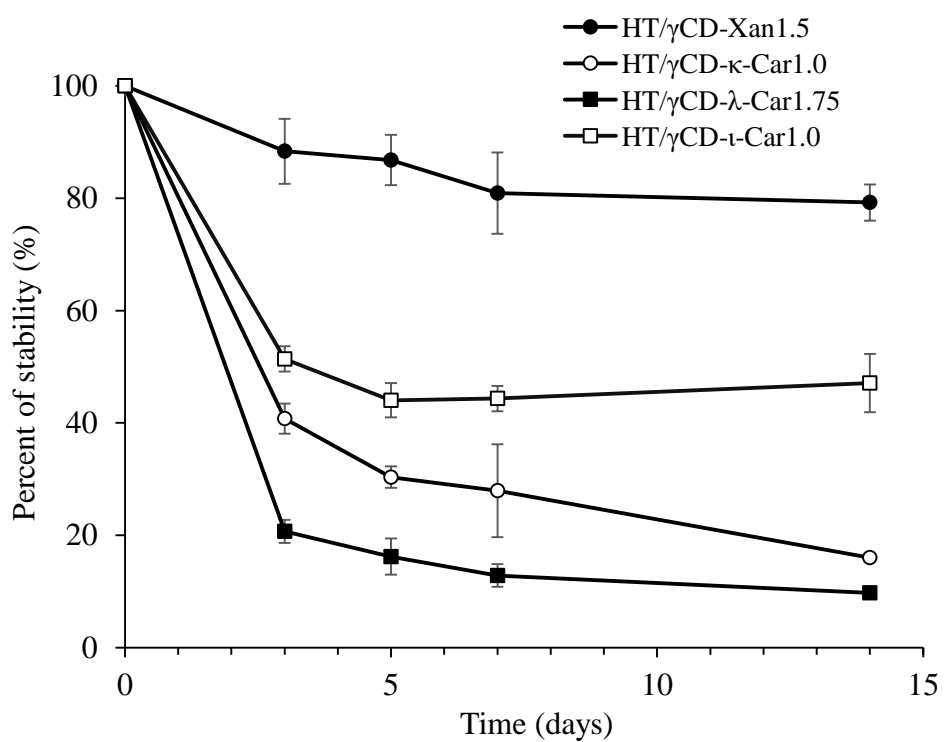


Fig. 64 Stability test of HT/γCD gels at 4°C, RH 33 %. Results were expressed as mean \pm S.D. (n=3).

第4節 HT/ γ CD 複合体ゲル化製剤の使用感の評価

皮膚に塗布した際の使用感の評価を行うために、フリクシオメーターを用いて摩擦力測定を行った (Fig. 65)。Neto らの報告により、フリクシオメーターは化粧品分野において、皮膚を想定した使用感の評価に用いられている¹⁷⁰⁾。

測定の結果、20 秒における摩擦力は EP: 30.4 N、HT/ γ CD-Xan1.5%: 48.3 N、HT/ γ CD- λ -Car1.75%: 39.1 N、HT/ γ CD- κ -Car1.0%: 129.8 N および HT/ γ CD- ι -Car1.0%: 83.7 N であった。摩擦力の大小関係はスプレッドメーターを用いて算出した降伏値とほぼ同様の結果となった。

摩擦力は、クリームやゲルの伸びなじみ、滑らかさと負の相関があり、べたつきに対して正の相関があるということが知られている。一般的に使用されているエタプラスゲル[®]は、今回実施した製剤の中で最も低値を示したことから、市場されているゲル化製剤の滑らかさを示す挙動を把握できた。このことから、エタプラスゲル[®]と同様の挙動を示した HT/ γ CD-Xan1.5% および HT/ γ CD- λ -Car1.5% は、他のゲル化製剤と比較し皮膚に塗布した際、べたつかず、滑らかでなじみが良いことが予測された。

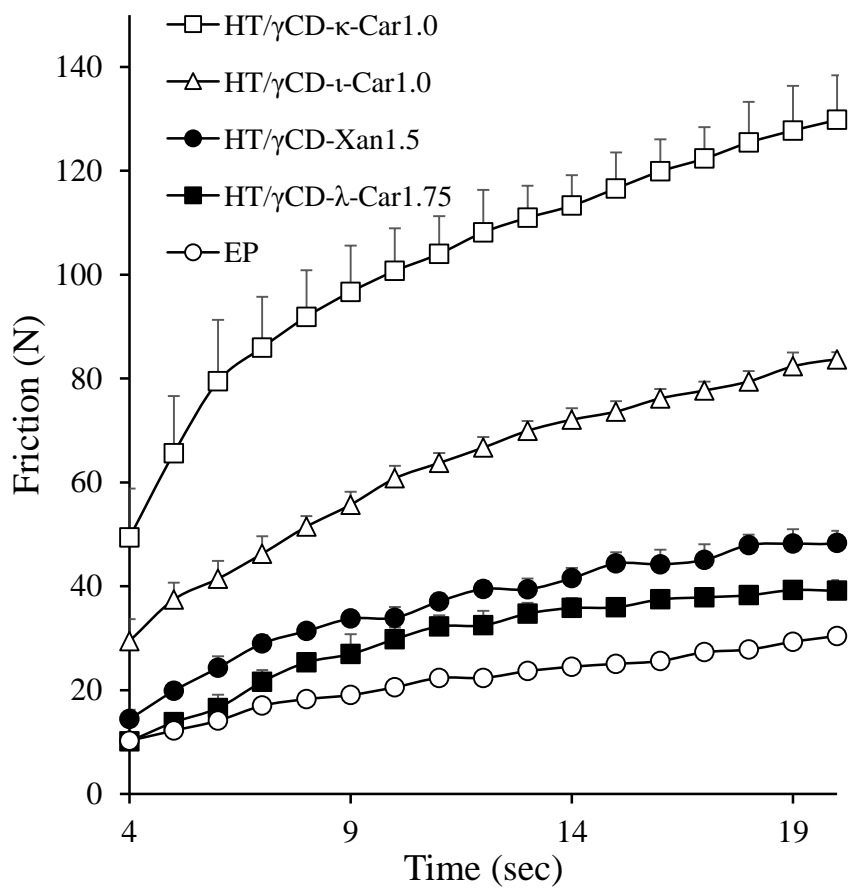


Fig. 65 Skin friction of HT/γCD gels.
Results were expressed as mean \pm S.D. (n=3).

第3章 小括

本研究において、HT/ γ CD 包接複合体を含有するゲル化製剤の調製を行った。分散性、粘性、pH、粘弾性、展延性、放出性および安定性の評価の結果、HT/ γ CD-Xan1.5%が簡便な使用方法を目指したヒノキチオールゲル化製剤として皮膚適応に有用である。

総括

本研究では、天然由来の抗菌成分として 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、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。まず第1章では、HT/CDs 複合体の調製、物理化学的性質の検討および溶出性の評価を行った。第2章では、HT/CDs 複合体の抗菌および抗真菌活性の評価を行った。第3章では、HT/ γ CD 複合体含有ゲル化製剤の調製および物理化学的性質の評価を行った。以下に本研究で得られた知見を総括する。

第1章

第1章では、HT、CDs および HT/CDs 複合体それぞれの物理化学的性質の評価を行った。各種機器分析を用いた物理化学的性質の評価の結果、混合粉砕法による HT/CDs 包接複合体の形成が確認された。混合粉砕法による複合体形成メカニズムとして、粉砕により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ており、粉体間での複合体調製を可能とすることが示された。熱不安定性および揮発性を有する HT にとって、固体状態にて複合体を形成する手法を見いだせたことは、今後の製剤応用へつながる有用な知見となった。

得られた HT/CDs 複合体の溶出挙動は、用いた CD の特性に応じて異なることが確認された。その特性は、CD 分子中における HT の包接構造が起因しており、その結果、HT の溶出コントロールが可能となった。

また、HT の基本骨格となる TPN では、HT 同様の調製法である混合粉砕法と比較として共沈法を用いて TPN/ γ CD 複合体の調製を試みた。機器分析を用いた物理化学的性質の評価の結果、混合粉砕法および共沈法を用いた TPN/ γ CD および包接複合体形成が明らかとなった。調製法の違いにより、異なる包接複合体を形成しており、

包接複合体のモル比は、混合粉碎法では TPN/ γ CD=2/1 および TPN/ γ CD=4/1 であり、共沈法では TPN/ γ CD=2/1 であった。また、GM (TPN/ γ CD=4/1) は、2 分子の TPN が γ CD 同士で形成される分子空間に封入していることが明らかとなった。HT および TPN において γ CD との複合体構造に違いが生じた要因として、ゲスト分子である HT と TPN の化学的性質が起因していることが予想された。両者の水溶性の違いが γ CD の空洞内と分子空間との親和性に影響した可能性がある。

以上より、HT および TPN とは共通の構造を持ちながら異なる複合体形成をすることで興味深い結果を得られた。

第 2 章

第 2 章では、有用性の評価として HT および HT/CDs 複合体の細菌および真菌に対する抗菌活性の評価を行った。寒天希釈法による抗菌試験の結果、細菌および真菌に対する MIC 値を算出することができ、HT および HT/CDs 複合体が細菌および真菌に対して活性を示すことが明らかとなった。

また、時間依存的な抗菌活性を示すのかを評価した結果、HT は微生物に対して、短時間で不可逆的な増殖抑制を示すことが確認された。HT/CDs 複合体において、用いる CD によって HT の抗菌活性を持続させることも可能とさせることが明らかとなった。また、真菌のなかでも抵抗性を示すものとして、糸状菌が存在する。消毒薬のなかでも、低水準性消毒薬などでは、糸状菌が抵抗性を示すことで十分な効果が得られないことがある。本研究において、HT が糸状菌である *A. brasiliensis* に対しても低濃度で効果を示したことは、効率的に生活環境の除菌を可能とすることが期待できる。

ヒトへの適応性を評価するために皮膚刺激性試験を行った結果、HT および HT/CDs 複合体は、皮膚刺激性がないことが示された。これより、より多くのヒトに対して使用することのできる抗菌成分として応用の幅を広げることができる。以上の結果から、

臨床現場での除菌目的としての HT/CDs 複合体の利用が期待できる。

第3章

本研究において、HT/ γ CD 包接複合体を含有するゲル化製剤の調製を行った。分散性、粘性、pH、粘弾性、展延性、放出性および安定性の評価の結果、HT/ γ CD-Xan1.5%が簡便な使用方法を目指したヒノキチオールのゲル化製剤として有用であることが確認された。ゲル化製剤において実施した物理化学的性質の評価で得られた結果は、ヒトへの外用剤としての使用感に反映されることが予測される。また、外用剤の使用感は継続して使用するためには必要不可欠であり、重要な指標となる。本研究において、HT の安定性を保ちながら HT/ γ CD 含有ゲル化製剤を調製し、市販品と同等の物性を示すことができた。よって、今後新規手指消毒用ゲル化製剤を開発するための基礎を構築することができた。

第4章 結論

本研究において、混合粉碎法を用いた HT/CDs 包接複合体の調製に成功した。興味深いことに、用いる CD によって HT との分子間相互作用に違いが生じた。これらの HT/CDs 包接複合体の立体的構造の違いは、HT の水への溶出性および抗菌活性に影響を及ぼすことが明らかとなった。HT/CDs 包接複合体のなかでも、HT/ γ CD 包接複合体が HT の効率的な抗菌作用を供給することが確認された。

HT/ γ CD 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/ γ CD 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。

論文目録

- 1) Rina Suzuki, Yutaka Inoue, Yuina Tsunoda, Isamu Murata, Yasunori Isshiki, Seiichi Kondo and Ikuo Kanamoto, Effect of γ -cyclodextrin derivative complexation on the physicochemical properties and antimicrobial activity of hinokitiol. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 83:177-186 (2015).
- 2) Rina Suzuki, Mizuki Tsuru, Yutaka Inoue, Toru Tanaka, Isamu Murata and Ikuo Kanamoto, Rheological characteristics of hinokitiol containing gels. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5(2): 18-31 (2016).
- 3) Rina Suzuki, Yutaka Inoue, Limmatvapirat, S., Isamu Murata, Ikuo Kanamoto, Molecular interactions of the inclusion complexes of hinokitiol and various cyclodextrins. *AAPS PharmSciTech*, 18(7):2717-2726 (2017).
- 4) Rina Suzuki, Yutaka Inoue, Isamu Murata, Ikuo Kanamoto, Properties of tropolone/ γ -cyclodextrin complexes prepared using different methods. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(9): 250-261 (2017).

謝辞

本研究に際し、終始懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました城西大学薬学部医薬品安全性学講座教授 金本 郁男 先生に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を遂行するに際して、数々の有益なる御指導ならびに御助言を賜りました城西大学薬学部医薬品安全性学講座准教授 井上 裕 先生に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究に関し、終始御親切な御指導、御協力を賜りました城西大学薬学部医薬品安全性学講座助手 村田 勇 先生に厚く御礼申し上げます。

本論文作成、学位論文審査にあたり、御教授と御校閲を賜りました城西大学薬学部病院薬剤学講座教授 上田 秀雄 先生、有機薬化学講座教授 山ノ井 孝 先生、食品機能学講座教授 真野 博 先生に感謝の意を表します。

本研究に際して有益なる御助言と御校閲を賜りました城西大学薬学部教授 近藤 誠一 先生、准教授 一色 恭徳 先生、助教 野村 陽恵 先生に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに際して有益なる御助言と御協力を賜りました星薬科大学生命機能創成科学研究室准教授 加藤 良規 先生に深く感謝の意を表します。

NMR スペクトル測定に労をとられた元城西大学機器分析センター 山口 貞樹 技術官ならびに城西大学機器分析センター 富田 惇輝 技術官に深く感謝致します。

シクロデキストリンを提供して戴きました株式会社シクロケムに深く感謝致します。

本研究における実験の遂行にあたり、励ましと御協力を下さいました城西大学薬学部医薬品安全性学講座諸氏また卒業生に心より感謝致します。

最後に、本研究を遂行する機会を与え、私の長きにわたる学生生活を温かく見守り、励まして下さいました家族に深く感謝致します。

実験の部

試薬

Hinokitiol (HT)	富士フイルム和光純薬株式会社
Tropolone (TPN)	Sigma-ALDRICH
α -Cyclodextrin (α CD)	株式会社シクロケム
β -Cyclodextrin (β CD)	株式会社シクロケム
γ -Cyclodextrin (γ CD)	株式会社シクロケム
Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD)	株式会社シクロケム
Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP β CD)	株式会社シクロケム
Triacetyl- β -Cyclodextrin (TA β CD)	東京化成工業株式会社
2-Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin (HP γ CD)	Sigma-ALDRICH
Xanthan gum	Sigma-ALDRICH
κ -Carrageenan	富士フイルム和光純薬株式会社
λ -Carrageenan	富士フイルム和光純薬株式会社
ι -Carrageenan	東京化成工業株式会社

その他の試料については、富士フイルム和光純薬株式会社製の試薬特級を用いた。

Table 6 Chemical structures and properties of α , β and γ CD.

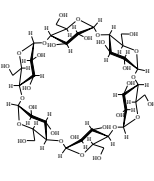
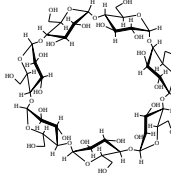
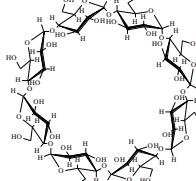
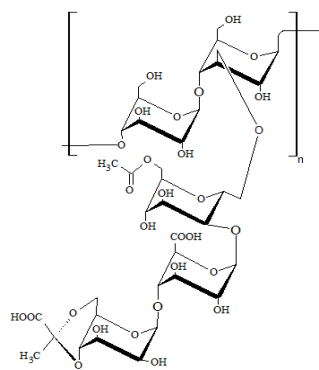
CDs			
	α -Cyclodextrin (α CD)	β -Cyclodextrin (β CD)	γ -Cyclodextrin (γ CD)
No. of glucose	6	7	8
Molecular weight	972	1135	1297
Internal diameter (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
External diameter (Å)	14.6	15.4	17.5
Cavity height (Å)	7.9	7.9	7.9
Water solubility (g/100 mL at 25°C)	14.5	1.85	23.2

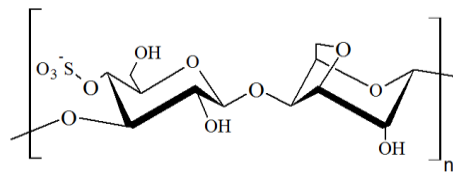
Table 7 Chemical structures of CD derivative.

Compound	Abbreviation	R	DS ¹⁾
2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin	HP β CD	H or CH ₂ (OH)CH ₃	0.6-0.9
Methyl- β -cyclodextrin	M β CD	H or CH ₃	0.6
Triacetyl- β -cyclodextrin	TA β CD	CH ₃ CO	-
2-Hydroxypropyl- γ -cyclodextrin	HP γ CD	H or CH ₂ (OH)CH ₃	0.6

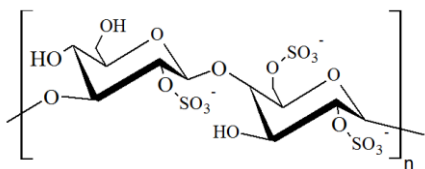
1) The average degree of substitution.



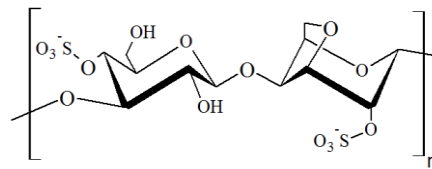
Xanthan gum



κ -Carrageenan



λ -Carrageenan



ι -Carrageenan

Fig. 66 Gel base structures of xanthan gum and each carrageenan

第 1 章

1. 試料の調製

1-1. HT/CDs 物理的混合物 (PM) の調製

HT と α CD をモル比 1/1、1/2 および 1/3 で秤量し、Vortex Mixer を用いて 1 分間混合した。

HT と CD (β CD、 γ CD、HP β CD、M β CD、TA β CD および HP γ CD) 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。

1-2. HT/CDs 混合粉砕物 (GM) の調製

PM (HT/ α CD=1/1、1/2 および 1/3) 1g をアルミナセルに充填後、振動型ロッドミル (CMT 社製 TI-500ET 型) を用いて 60 分間混合粉砕した。

PM (HT/ β CD、HT/ γ CD、HT/HP β CD、HT/M β CD、HT/TA β CD および HT/HP γ CD =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 (CMT 社製 TI-500ET 型) を用いて 60 分間混合粉砕した。各試料の調製方法を Scheme 1 に示す。

1-3. TPN/ γ CD 物理的混合物 (PM) の調製

TPN と γ CD をモル比 5/1、4/1、3/1、2/1 および 1/1 で秤量し、Vortex Mixer を用いて 1 分間混合した。

1-4. TPN/ γ CD 混合粉砕物 (GM) の調製

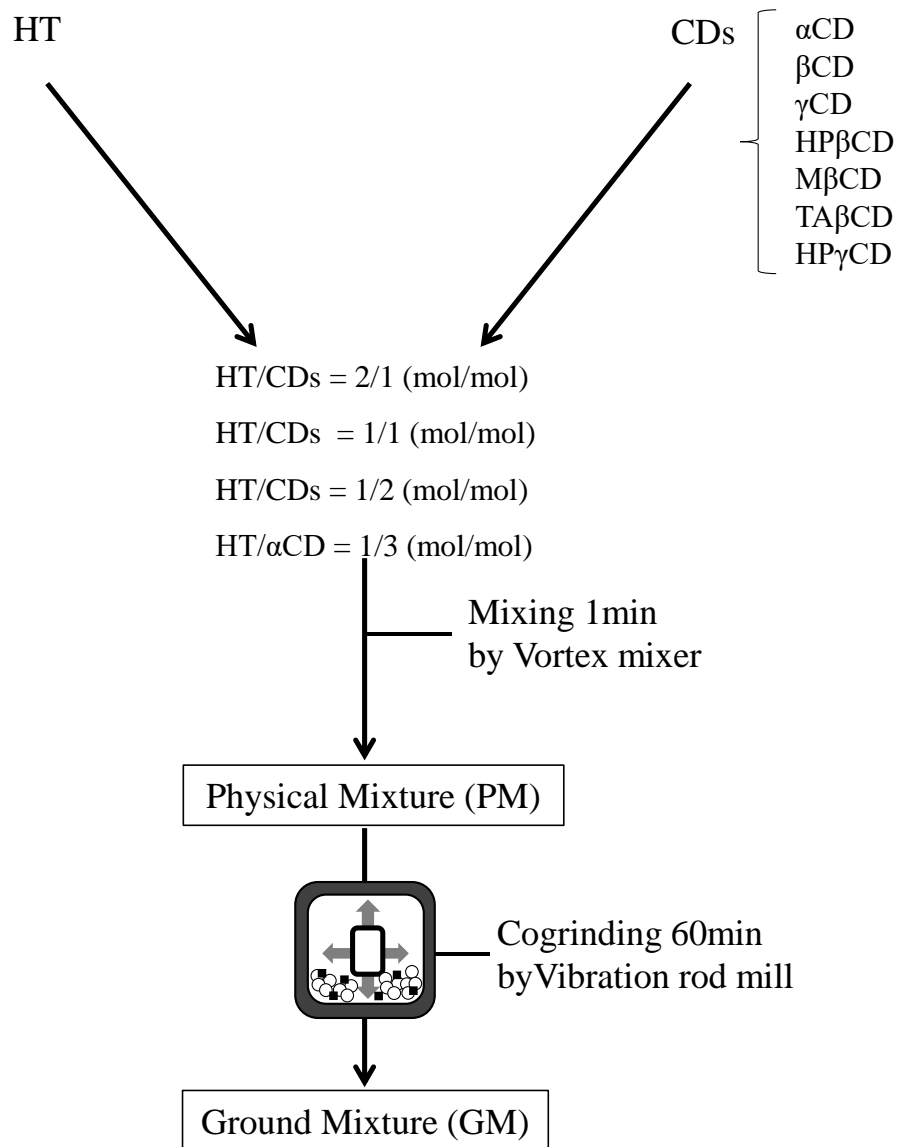
PM (TPN/ γ CD=5/1、4/1、3/1、2/1 および 1/1) 1g をアルミナセルに充填後、振動型ロッドミル (CMT 社製 TI-500ET 型) を用いて 30 分間混合粉砕した。各試料の調製方法を Scheme 2 に示す。

1-5. TPN/ γ CD 共沈物 (CP) の調製

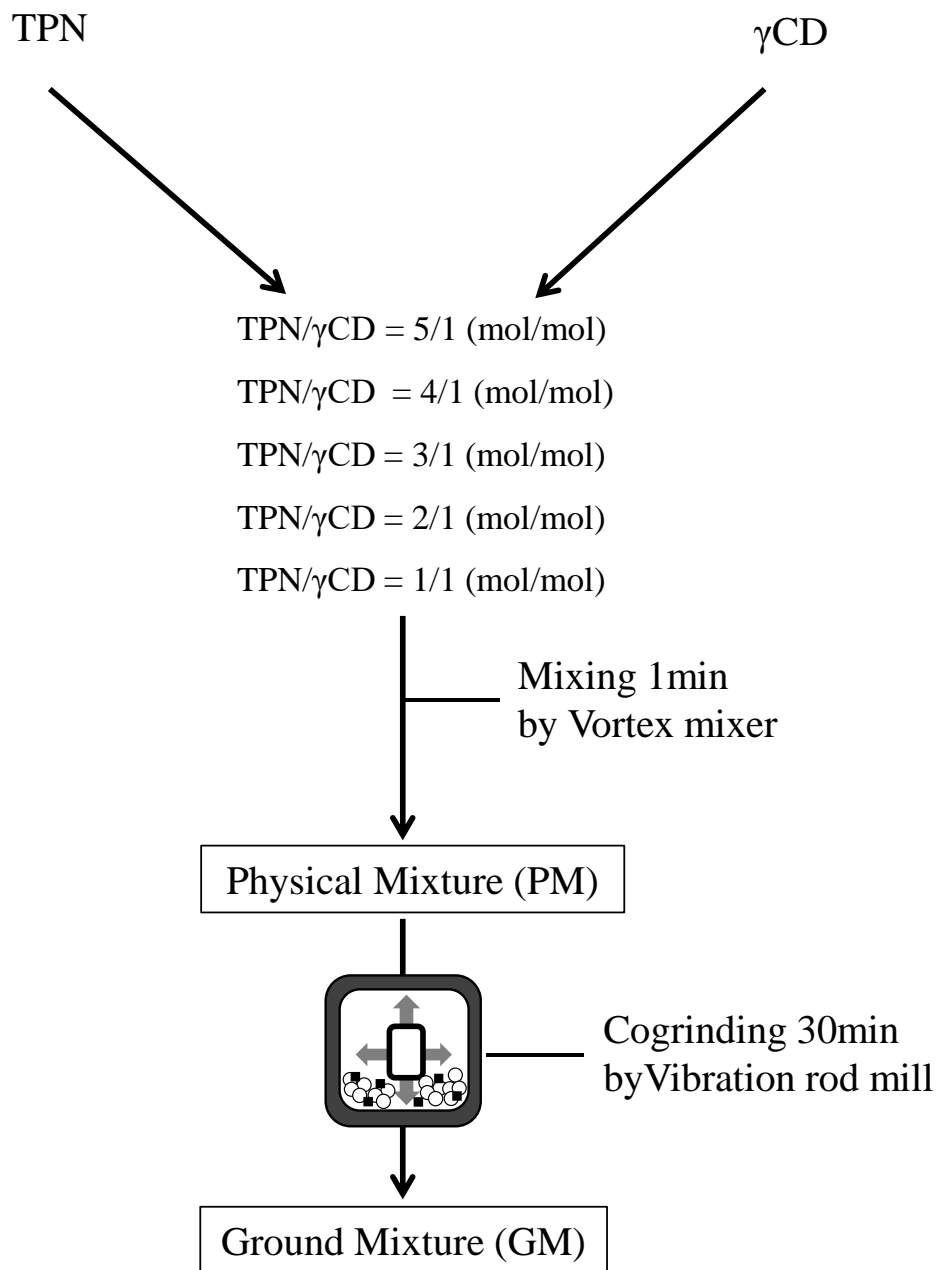
TPN 水溶液 (0.10 mol/L) 5 mL に対し、 γ CD 水溶液 (0.13 mol/L) 5 mL を少量ずつ加え、室温下で 6 時間攪拌後、室温で 24 時間静置した。その後、沈殿物を濾別し、デシケーター中で室温、減圧下 24 時間乾燥した。試料の調製方法を Scheme 3 に示す。

1-6. 調湿保存

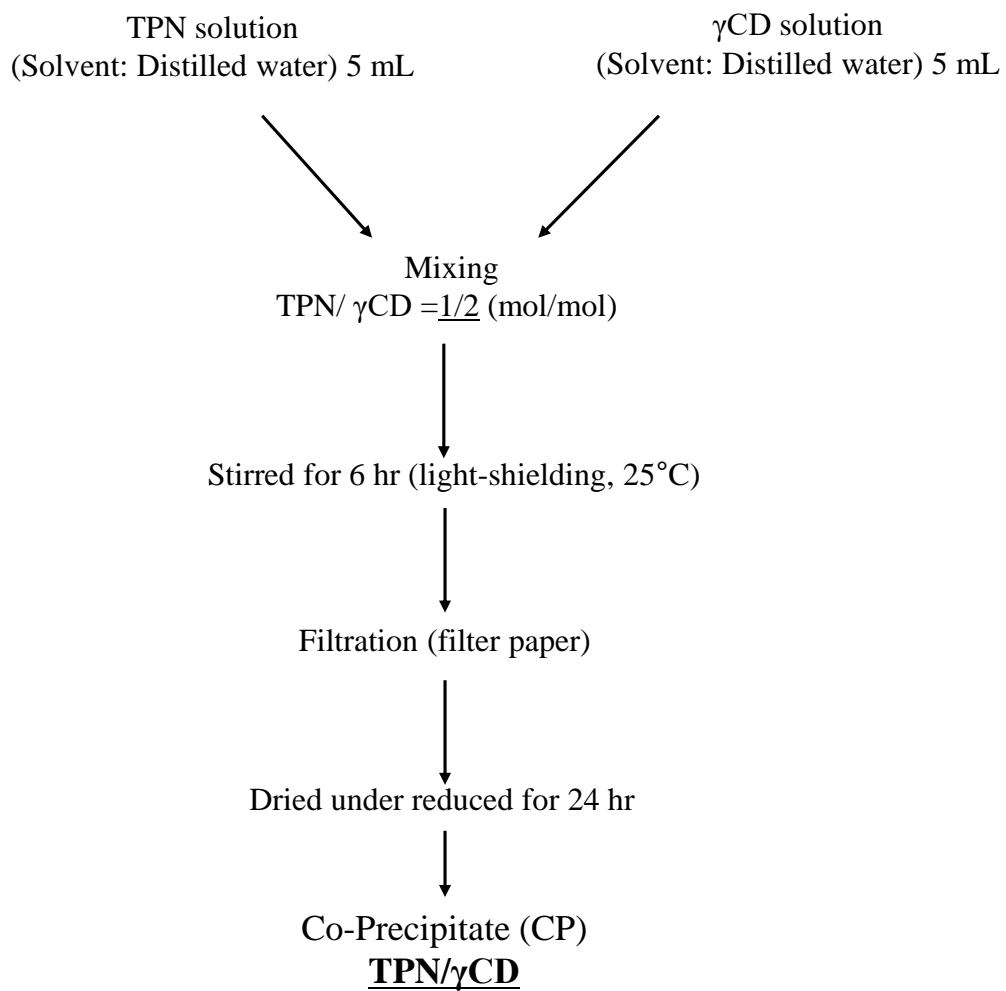
GM を 40°C、相対湿度 (RH) 82% に調整した塩化カリウム飽和水溶液共存下のデシケーター内に保存することで調湿再結晶化を行った。



Scheme 1 Ground Mixture method of HT/CDs systems.



Scheme 2 Ground Mixture method of TPN/ γ CD systems.



Scheme 3 Co-precipitate method of TPN/γCD system.

2. 測定方法

2-1. job's plot

HT/CDs の包接錯体の化学量論は、variation method (Job's plot) によって決定した¹⁷⁾。HT と CDs の総濃度を一定に維持し、HT/CDs のモル分率を 0 から 1 の間で変化させ、試験液を調製した。試験液が平衡状態になった後、試料を 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過し、得られた濾液は水/メタノール = 2/8 に希釈した。定量は UV-2500PC 紫外可視分光光度計 (Shimadzu 社製) を使用した。励起波長を 240 nm とし、溶媒をブランクとして Zero Set を行った。

2-2. 粉末 X 線回折 (PXRD) 測定

MinFlexII型粉末 X 線回折装置 (Rigaku 製) を使用し、回折強度は NaI シンチレーションカウンターにより測定した。X 線としては Cu 線 (30 kV, 15 mA) を用い、X 線回折測定には 4°/min のスキャン条件を用い、測定範囲は $2\theta=3^\circ\text{-}35^\circ$ とした。粉末試料をガラスプレートに試料平面が平坦になるように充填して測定した。

2-3. 示差走査熱量 (DSC) 測定

Thermo plus Evo 高感度示差走査熱量計 (Rigaku 製) を使用した。測定は、試料約 2 mg をアルミニウム製パンに充填し密封したのち、窒素ガス気流下 (60 mL/min)、昇温速度 5 °C/min で行った。

2-4. 熱重量 (TG) 測定

Thermo plus Evo 高感度示差走査熱量計 (Rigaku 製) を使用した。測定は、試料約 10 mg をアルミニウム製パンに充填し、窒素ガス気流下 (200 mL/min)、昇温速度 5 °C/min で行った。

2-5. ¹H-核磁気共鳴 (NMR) スペクトル測定

VarianNMR System 400 MHz (アジレントテクノロジー社製) を使用した。Dimethyl sulfoxide-d₆ (DMSO-d₆) を溶媒に用い、室温において積算回数 128 で測定した。

包接モル比は次式で求めた。

$$\text{包接モル比} = \frac{\text{Guest (mol)}}{\text{Host (mol)}} = \frac{\text{Guest 分子 1H あたりの積分値}}{\text{Host 分子 1H あたりの積分値}} \quad \dots \text{式(1)}$$

2-6. 赤外 (IR) 吸収スペクトル測定

JASCO FT/IR-410 (日本分光社製) を用いて、KBr 錠剤法にて行った。積算回数を 32 times で分解能を 4 cm⁻¹ とし、測定波数範囲は 4000-400 cm⁻¹ とした。錠剤の調製方法は、試料に臭化カリウム (KBr) を重量比 1/10 (試料/KBr) の割合で加えて混合し、手動プレスで圧縮した。バックグラウンド補正は KBr 単独打錠を用いて行った。

2-7. 固体蛍光スペクトル測定

RF-5300PC 蛍光分光光度計 (Shimadzu 社製) を使用した。光路長が 5 mm の四面透明石英ガラスセルを用いてスリット幅を 5 nm で励起波長を 359 nm とし、測定蛍光波長範囲は 360-600 nm とした。

2-8. 溶出試験

NTR-593, Toyama Sangyo 型溶出試験器を用い、日本薬局方第 17 法改正溶出試験法 (パドル法) に準じて行った。HT が 50 mg となるように調製した粉末試料を試験液に投入後試験を開始し、0、5、10、15、30 および 60 分ごとに 10 mL の試料液を採取した。採取した試料液を、0.45 μm のメンブランフィルターで濾過した。濾液は水/メ

タノール=2/8 溶液で希釈し、定量は UV-2500PC 紫外可視分光光度計 (Shimadzu 社製) を用いて波長 240 nm にて測定した。

2-9. ^1H - ^1H 2D-COSY NMR スペクトル測定

Varian NMR System 700 MHz (アジレントテクノロジー社製) を使用した。D₂O を溶媒に用い、共鳴周波数は 699.6 MHz、緩和時間は 1500 ms、25 °C において積算回数 256 で測定した。

2-10. ^1H - ^1H 2D-NOESY NMR スペクトル測定

Varian NMR System 700 MHz (アジレントテクノロジー社製) を使用した。D₂O を溶媒に用い、共鳴周波数は 699.6 MHz、緩和時間は 1500 ms、25 °C において積算回数 256 で測定した。

2-11. ^1H - ^1H 2D-ROESY NMR スペクトル測定

Varian NMR System 700 MHz (アジレントテクノロジー社製) を使用した。D₂O を溶媒に用い、共鳴周波数は 699.6 MHz、パルス幅は 90 °、緩和時間は 200 ms、スキャン時間 0.500 s、25 °C において積算回数 256 で測定した。

第 2 章

1. 抗菌試験

寒天希釈法による HT の MIC 測定は、CLSI M7-A5 を基本とした (Scheme 5)¹⁷²⁾。

試験菌はグラム陽性菌 2 種 (*Bacillus subtilis* NBRC3134、*Staphylococcus aureus* JCM2413)、グラム陰性菌 2 種 (*Escherichia coli* JCM5491、*Pseudomonas aeruginosa* JCM6119) の細菌 4 種を使用した。

試験培地は Mueller-Hinton II Agar 培地 (MHA、BD) を用いた。MHA 100 mL 中に HT の濃度が 320 $\mu\text{g/mL}$ になるように試料を加え、泡立たないように十分に攪拌した。HT 含有 MHA をもとに MHA で順次 2 倍希釈して HT の 2 倍希釈培地列を作成した後、シャーレに流し込み固化した。作成した試験培地に、各試験菌株を 2.0×10^6 CFU/mL になるように調製した試験菌懸濁液を 5 μL 植菌して乾燥させた。これらの試験プレート を 37 °C の恒温器中で 24 時間培養した。HT および HT/CDs 複合体の各菌種における MIC は、培養後にコロニーの形成の有無を目視にて判定し、MIC を測定した¹⁷³⁾。

2. Time-kill assay

Time-kill assay は、CLSI 基準法に基づく Balth らの方法に準じて行った。試験菌懸濁原液を最終濃度が 1.0×10^8 CFU/mL となるように 37 °C、約 4 時間ロータリーシェーカー (NR-3、TITEC) で振盪培養 (130 rpm) した。試料を添加した後、再び 25 °C で攪拌 (150 rpm) した。試料を添加する直前 (0 時間)、添加後 1、3、6、12 および 24 時間後に培養液を採取し、試験原液とした。試験原液を Trypticase Soy Agar 培地 (TSA 培地、BD) の寒天培地上に塗布し、37 °C、14-16 時間培養した。培養後、形成されたコロニー数を計測し、試験原液中の *E.coli* の濃度 (CFU/mL) を算出した。

3. 細胞膜電位試験

細胞膜電位試験は、細胞内蛍光プローブとして DiBAC₄(3) (Bis(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol, sodium salt、同仁化学研究所) を用いた。試験菌は、グラム陰性菌 1 種 (*Escherichia coli* JCM5491) を使用した。Positive control として、細胞膜の電位に変化を及ぼす Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone (CCCP) を使用した。Negative control として、培養した菌液をオートクレーブで 100°C、30 分滅菌加熱処理を行った。

試験菌懸濁原液を最終濃度が 5.0×10^6 CFU/mL となるように 37 °C、約 4 時間振とう培養 (130 rpm) した。試験液に菌液および試料を添加した後、再び 25 °C で攪拌 (150 rpm) した。試料を添加後 1 時間後に培養液を採取し、試験原液とした。採取した培養液を遠心分離後、上清を吸引し、DiBAC₄(3) 試薬と反応させ、フローサイトメーター EPICS XL (ベックマン・コールター社製) にて蛍光強度を測定した。

4. 細胞膜傷害試験

細胞膜傷害試験は、LIVE/DEAD[®] BacLight Bacterial Viability Kits を用いて行った。試験菌は、グラム陰性菌 1 種 (*Escherichia coli* JCM5491) を使用した。試験菌懸濁原液を最終濃度が 5.0×10^6 CFU/mL となるように 37 °C、約 4 時間振とう培養 (130 rpm) した。試験液に菌液および試料を添加した後、再び 25 °C で攪拌 (150 rpm) した。試料を添加後 3、9 および 24 時間後に培養液を採取し、試験原液とした。採取した培養液を遠心分離後、上清を吸引し、BacLight 試薬と反応させ、15 分間 37°C でインキュベートした後、フローサイトメーター EPICS XL (ベックマン・コールター社製) にて生菌および死菌を計測した。

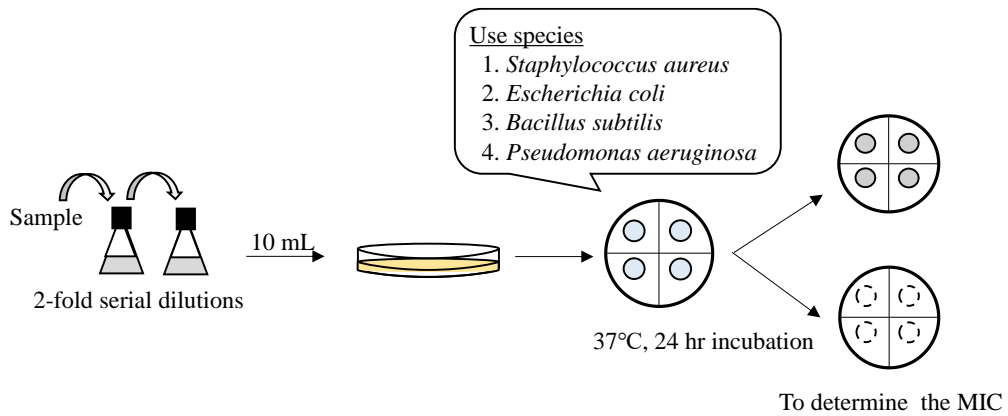
5. 抗真菌試験

HT の真菌に対する MIC 値を算出するために、寒天希釈法を用いて評価した (Scheme 5)。

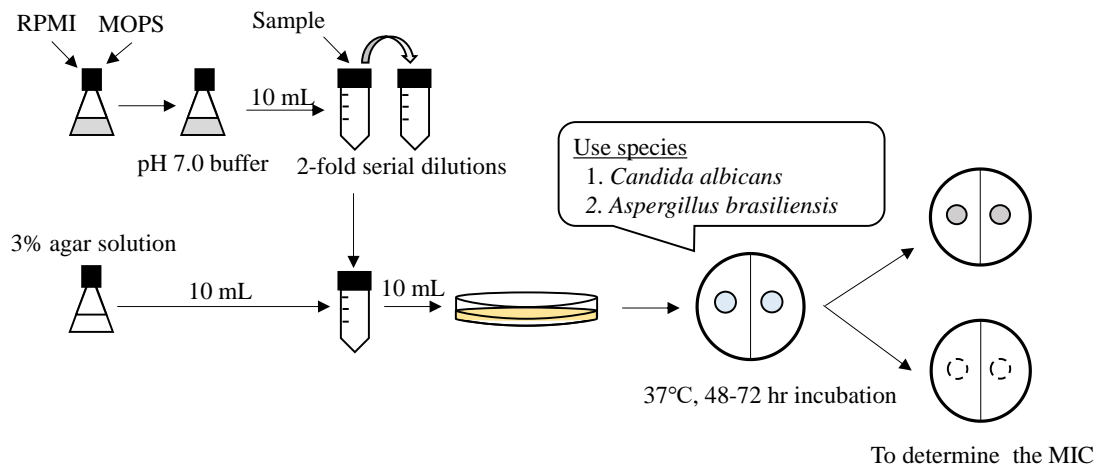
試験菌は、*Candida albicans* (*C. albicans*) と *Aspergillus brasiliensis* (*A. brasiliensis*) の真菌 2 種を用いた。HT および HT/CDs 複合体を滅菌水で調製し、RPMI1640 培地 (グルタミン含有) で希釈した。これらの溶液に 0.165 M モルホリンプロパンスルホン酸 (MOPS) 緩衝液を用いて pH7.0 に緩衝した。HT の濃度が 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように試料を加え、泡立たないように十分に攪拌した。HT 含有 RPMI1640 培地をもとに RPMI1640 培地で順次 2 倍希釈して HT の 2 倍希釈培地列を作成した。調製した培地に、3%寒天溶液を加え、十分に攪拌した後、シャーレに流し込み固化した。作成した寒天培地に、各試験菌株を 2.0×10^6 CFU/mL になるように調製した試験菌懸濁液を 5 μL 植菌して乾燥させた。これらの試験プレートを 37 °C の恒温器中で 48-72 時間培養した。HT および HT/CDs 複合体の各菌種における MIC は、培養後にコロニーの形成の有無を目視にて判定し、MIC を測定した。

5. 皮膚刺激性試験

ヒノキチオールおよび包接化合物の皮膚への影響を評価するため、Hairless マウスを用いて実施した。マウスを混合麻酔液 (Medetomidine; Midazolam; Butorphanol) の腹腔内投与により眠らせた後、各薬液をマウスの背部に、綿棒を用いておよそ 400 mm^3 ほどの領域に塗布した。薬液処置を 4 日間連続で行い、5 日目にマウスを安楽死させ、薬物塗布部位の皮膚を摘出した。摘出後の皮膚は、ホルマリン固定し、H&E 染色により各薬液の皮膚への影響を評価した。



Scheme 4 Antibacterial test by the agar dilution method.



Scheme 5 Antifungal test by the agar dilution method.

第3章

1. HT/ γ CD 混合粉砕物 (GM) の調製

第1章同様の調製方法を用いて調製した。

2. ゲル化製剤の調製

蒸留水 10 mL を水浴中で 80 °C に加温し、各ゲル化基材を混合し、均一になるよう攪拌機で 3 分間、260 rpm にて混合し、ゾル状態を得た。このゾル試料が 45 °C 以下になるまで静置し、その後遮光下で HT/ γ CD 水溶液を 1 mL 滴下し、再び攪拌機で 3 分間混合した。このゲル試料を遮光下で室温にて 30 分間静置し、その後、4 °C にて保存した (Scheme 6)。

3. 外観、分散性の評価

調製した各ゲル化製剤を目視にて観察した。また、蛍光顕微鏡 (OPYMPUS 社製) を用いて 494 nm の波長にて観察した。各サンプルはスライドガラスの上に塗布し、その上からカバーガラスにて固定した。

4. 粘度測定・粘弾性測定

E 型回転粘度計 (TVE-20H、東機産業社製) を用いた。測定時間 600 秒、コーンローター 1° 34' x R24、測定温度 25 °C、サンプル量 1 mL で測定した。粘度測定の場合はローター回転数毎分 1 回転とし、ローター回転 180 秒後の粘度を読み取り測定を行った。粘弾性測定は剪断速度 0 s^{-1} - 20 s^{-1} → 20 s^{-1} - 0 s^{-1} で 1 秒毎の粘度 (Epa (Pa · s))、応力 (Tau(Pa)) の回復挙動を測定した。

5. pH 測定

pH メーター (Sartorius 社製) を用いた。各サンプルをそれぞれ 10 mL 秤量し測定した。

6. 降伏値の算出

スプレッドメーター (離合社製) を用いた。条件は測定温度 25 °C、ガラス重量 114.2 g で、測定時間 5、10、30、60、120、180、240、300、360 および 420 秒後の拡がり直径を測定した。降伏値は 360 秒後値を用いて次の式より算出した。

$$F = 47040 * G * V / \pi^2 * D^5$$

F : yield value (dyne/cm²)

G : glass plate weight (114.2 g)

V : sample size (cm³)

D : diameter (mm) when sample spreading stopped

7. 放出試験

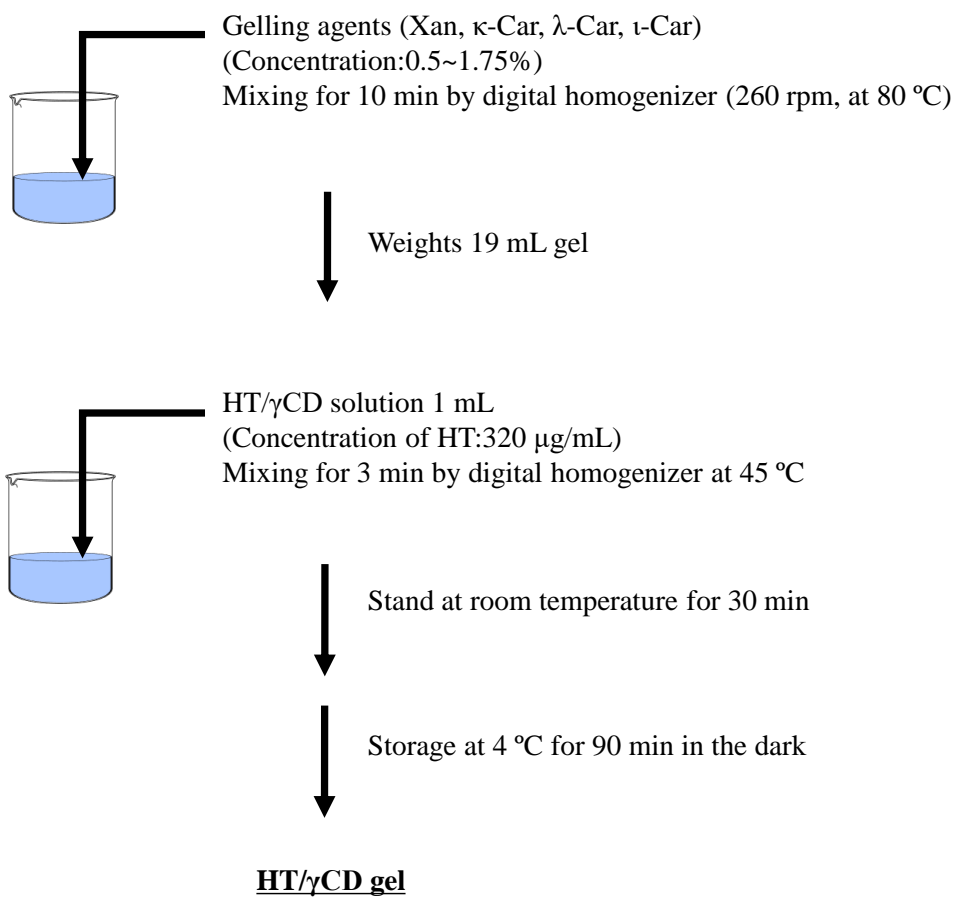
放出試験は、富山産業社製溶出試験器を用いて行った。試験液として日本薬局方精製水 900 mL を用いた。測定温度は 32 ± 0.5 °C、なお、一般的に皮膚表面の温度は 32 °C であるため、この温度で行った。回転数は 50 rpm とし、日本薬局方第 17 法改正溶出試験法 (パドル法) に準拠して実施した。試料採取は、0、5、10、15、30、45 および 60 分後に溶出液 10 mL を取り、孔径 0.45 μm メンブランフィルター (mixed cellulose ester non sterile) でろ過した。ろ液 5 mL を正確に量り、水/メタノール (1/8) 混液で 50 mL になるように正確に希釈し、試料溶液とした。定量は検出波長 240 nm とし、紫外可視吸光光度計 (UV:2500-PC) (Shimadzu 社製) により実施した。

8. 安定性試験

安定性試験の評価項目は、ゲル化製剤中の HT 含量に対する HT 残存量とした。各試料は、温度 4 °C、相対湿度 33 %で遮光下にて保管した後、0、3、5、7 および 14 日後の試料について安定性試験を実施した。定量は検出波長 240 nm とし、紫外可視吸光光度計 (UV:2500-PC) (Shimadzu 社製) により実施した。

9. 皮膚摩擦試験

各ゲル化製剤について皮膚摩擦試験をフリクシオメーター (Courage+Khazaka 社製) を用いて行った。各製剤 0.1g を人工皮膚上に塗布し、25°C、25rpm で 21 秒間測定した。



Scheme 6 Preparation of gels.

参考文献

- 1) Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science*. **257**, 1050-1055 (1992).
- 2) Laxminarayan R, Matsoso P, Pant S, Brower C, Røttingen JA, Klugman K, Davies S. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet*. **387**(10014), 168-175 (2016).
- 3) Martin-Loeches I, Torres A, Rinaudo M, Terraneo S, de Rosa F, Ramirez P, Diaz E, Fernández-Barat L, Li Bassi GL, Ferrer M. Resistance patterns and outcomes in intensive care unit (ICU)-acquired pneumonia. Validation of European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) classification of multidrug resistant organisms. *J Infect*. **70**, 213-222 (2015).
- 4) Cleidson Valgas, Simone Machado de Souza, Elza F A Smânia, Artur Smânia Jr. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz. J. Microbiol*. **38**, 369-380 (2007).
- 5) Veiga AS, Sinthuvanich C, Gaspar D, Franquelim HG, Castanho MA, Schneider JP. Arginine-rich self-assembling peptides as potent antibacterial gels. *Biomaterials*. **33**(35), 8907-8916 (2012).
- 6) Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev*. **12**, 564-582 (1999).
- 7) Trust TJ. Antibacterial Activity of Tropolone. *Antimicrob. Agents Chemother*. **7**(5), 500-506 (1975).

- 8) Ye J, Xu YF, Lou LX, Jin K, Miao Q, Ye X, Xi Y. Anti-inflammatory effects of hinokitiol on human corneal epithelial cells: an in vitro study. *Eye (Lond)*. **29**(7), 964-971 (2015).
- 9) Kadoma Y, Ishihara M, Yokoe I, Fujisawa S. Kinetic radical-scavenging activity of colchicine and tropolone. *In Vivo*. **21**(3), 481-486 (2007).
- 10) Lee YS, Choi KM, Kim W, Jeon YS, Lee YM, Hong JT, Yun YP, Yoo HS. Hinokitiol inhibits cell growth through induction of S-phase arrest and apoptosis in human colon cancer cells and suppresses tumor growth in a mouse xenograft experiment. *J Nat Prod*. **76**(12), 2195-2202 (2013).
- 11) Jiménez C, Ellahioui Y, Álvarez R, Aramburu L, Riesco A, González M, Vicente A, Dahdouh A, Ibn Mansour A, Jiménez C, Martín D, Sarmiento RG, Medarde M, Caballero E, Peláez R. Exploring the size adaptability of the B ring binding zone of the colchicine site of tubulin with para-nitrogen substituted isocombretastatins. *Eur J Med Chem*. **11**, 210-222 (2015).
- 12) Inamori Y, Tsujibo H, Ohishi H, Ishii F, Mizugaki M, Aso H, Ishida N. Cytotoxic effect of hinokitiol and tropolone on the growth of mammalian cells and on blastogenesis of mouse splenic T cells. *Biol Pharm Bull*. **16**(5) 521-523 (1993).
- 13) Oblak EZ, Bolstad ES, Ononye SN, Priestley ND, Hadden MK, Wright DL. The furan route to tropolones: probing the antiproliferative effects of β -thujaplicin analogs. *Org Biomol Chem*. **10**, 8597-8604 (2012).
- 14) Komaki N, Watanabe T, Ogasawara A, Sato N, Mikami, T, Matsumoto T. Antifungal mechanism of hinokitiol against *Candida albicans*. *Bio Pharm Bull*. **31**, 735-737 (2008).

- 15) Yen T.B, Chang H.T, Hsieh C.C, Chang S.T. Antifungal properties of ethanolic extract and its active compounds from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* (Florin) heartwood. *Bioresour. Technol.* **99**, 4871-4877 (2008).
- 16) Miyamoto D, Kusagaya Y, Endo N, Sometani A, Takeo S, Suzuki T, Arima Y, Nakajima K, Suzuki Y. Thujaplicin-copper chelates inhibit replication of human influenza viruses. *Antiviral Res.* **39**(2), 89-100 (1998).
- 17) Koufaki M, Theodorou E, Alexi X, Nikoloudaki F, Alexis M.N. Synthesis of tropolone derivatives and evaluation of their in vitro neuroprotective activity. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 1107-1112 (2010).
- 18) Choi Y.G, Bae E.J, Kim D.S, Park S.H, Kwon S.B, Na J.I, Park K.C. Differential regulation of melanosomal proteins after hinokitiol treatment. *J. Dermatol. Sci.* **43**, 181-188 (2006).
- 19) Shih M.F, Chen L.Y, Tsai P.J, Cherng J.Y. In vitro and in vivo therapeutics of β -thujaplicin on LPS-induced inflammation in macrophages and septic shock in mice. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **25**, 39-48 (2012).
- 20) Liu S, Yamauchi H. p27-Associated G1 arrest induced by hinokitiol in human malignant melanoma cells is mediated via down-regulation of pRb, Skp2 ubiquitin ligase, and impairment of Cdk2 function. *Cancer. Lett.* **286**, 240-249 (2009).
- 21) Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* **329**(1-2), 1-11 (2007).
- 22) Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **59**, 645-666 (2007).

- 23) Inoue Y, Yamazoe T, Watanabe S, Murata I, Kanamoto I. Examination of intermolecular interaction as a result of cogrinding actarit and β -cyclodextrin. *J. Inclusion Phenom. Macrocycl. Chem.* **78**, 457-464 (2014).
- 24) Abd El-Gawad AEH, Soliman OA, El-Dahan MS, Al-Zuhairy SAS. Improvement of the Ocular Bioavailability of Econazole Nitrate upon Complexation with Cyclodextrins. *AAPS PharmSciTech.* **18**(5), 1795-1809 (2017).
- 25) Van den Hoven JM, Metselaar JM, Storm G, Beijnen JH, Nuijen B. Cyclodextrin as membrane protectant in spray-drying and freeze-drying of PEGylated liposomes. *Int J Pharm.* **438**, 209-216 (2012).
- 26) Cabral-Marques H, Almeida R. Optimisation of spray-drying process variables for dry powder inhalation (DPI) formulations of corticosteroid/cyclodextrin inclusion complexes. *Eur J Pharm Biopharm.* **73**, 121-129 (2009).
- 27) Corti G, Capasso G, Maestrelli F, Cirri M, Mura P. Physical-chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl-beta-cyclodextrin. *J Pharm Biomed Anal.* **45**(3), 480-486 (2007).
- 28) Ogawa N, Higashi K, Nagase H, Endo T, Moribe K, Loftsson T, Yamamoto K, Ueda H. Effects of cogrinding with β -cyclodextrin on the solid state fentanyl. *J. Pharm. Sci.* **99**, 5019-5029 (2010).
- 29) Di Donato C, Lavorgna M, Fattorusso R, Isernia C, Isidori M, Malgieri G, Piscitelli C, Russo C, Russo L, Iacovino R. Alpha- and Beta-Cyclodextrin Inclusion Complexes with 5-Fluorouracil: Characterization and Cytotoxic Activity Evaluation. *Molecules.* **21**(12), 1644 (2016).

- 30) Zhang JQ, Jiang KM, An K, Ren SH, Xie XG, Jin Y, Lin J. Novel water-soluble fisetin/cyclodextrins inclusion complexes: Preparation, characterization, molecular docking and bioavailability. *Carbohydr. Res.* **418**, 20-28 (2015).
- 31) Schwarz DH, Engelke A, Wenz G. Solubilizing steroidal drugs by β -cyclodextrin derivatives. *Int J Pharm.* **531**(2), 559-567 (2017).
- 32) Serio N, Levine M. Efficient extraction and detection of aromatic toxicants from crude oil and tar balls using multiple cyclodextrin derivatives. *Mar Pollut Bull.* **95**(1), 242-247 (2015).
- 33) Yang X, Zhao Y, Chen Y, Liao X, Gao C, Xiao D, Qin Q, Yi D, Yang B. Host-guest inclusion system of mangiferin with β -cyclodextrin and its derivatives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* **33**(4), 2386-2391 (2013).
- 34) Gidwani B, Vyas A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *Biomed Res Int.* **2015**, 198268 (2015).
- 35) Saokham P, Muankaew C, Jansook P, Loftsson T. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. *Molecules.* **23**(5), 1161 (2018).
- 36) Ge X, Huang Z, Tian S, Huang Y, Zeng C. Complexation of carbendazim with hydroxypropyl- β -cyclodextrin to improve solubility and fungicidal activity. *Carbohydr. Polym.* **89**(1), 208-212 (2012).
- 37) Kringel DH, Antunes MD, Klein B, Crizel RL, Wagner R, de Oliveira RP, Dias ARG, Zavareze EDR. Production, Characterization, and Stability of Orange or Eucalyptus Essential Oil/ β -Cyclodextrin Inclusion Complex. *J Food Sci.* **82**(11), 2598-2605 (2017).

- 38) Yang LJ, Xia S, Ma SX, Zhou SY, Zhao XQ, Wang SH, Li MY, Yang XD. Host-guest system of hesperetin and β -cyclodextrin or its derivatives: Preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* **59**, 1016-1024 (2016).
- 39) Müller BW, Brauns U. Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin derivatives: influence of average degree of substitution on complexing ability and surface activity. *J Pharm Sci.* **75**(6), 571-572 (1986).
- 40) Negi JS, Singh S. Spectroscopic investigation on the inclusion complex formation between amisulpride and γ -cyclodextrin. *Carbohydr Polym.* **92**, 1835-1843 (2013).
- 41) Saokham P, Muankaew C, Jansook P, Loftsson T. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. *Molecules* **23**(5), 1161 (2018).
- 42) Pal A, Gaba R, Soni S. Effect of presence of α -cyclodextrin and β -cyclodextrin on solution behavior of sulfathiazole at different temperatures: Thermodynamic and spectroscopic studies. *J Chem Thermodyn.* **119**, 102-113 (2018).
- 43) Ulatowski F, Dąbrowa K, Bałakier T, Jurczak J. Recognizing the Limited Applicability of Job Plots in Studying Host-Guest Interactions in Supramolecular Chemistry. *The Journal of Organic Chemistry.* **81**(5), 1746-1756 (2016).
- 44) Ma M, Shang W, Xing P, Li S, Chu X, Hao A, Liu G, Zhang Y. A supramolecular vesicle of camptothecin for its water dispersion and controllable releasing. *Carbohydr Res.* **402**, 208-214 (2015).
- 45) Panghal D, Nagpal M, Thakur GS, Arora S. Dissolution Improvement of Atorvastatin Calcium using Modified Locust Bean Gum by the Solid Dispersion Technique. *Sci Pharm.* **82**(1), 177-191 (2013).

- 46) Qifang W, Sanming L, Xin C, Xiaowen F, Chaojie L. Dissolution improvement and stabilization of ibuprofen by co-grinding in a β -cyclodextrin ground complex. *Asian J. Pharm. Sci.* **5**, 185-190 (2010).
- 47) Fernandes C.M, Teresa Vieira M, Veiga F.J. Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine-cyclodextrins inclusion compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* **15**, 79-88 (2002).
- 48) Nakai Y, Yamamoto K, Terada K, Kajiyama A, Sasaki I. Properties of crystal water of α -, β -, and γ -cyclodextrin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* **34**, 2178-2182 (1986).
- 49) Inoue Y, Iohara D, Sekiya N, Yamamoto M, Ishida H, Sakiyama Y, Hirayama F, Arima H, Uekama K. Ternary inclusion complex formation and stabilization of limaprost, a prostaglandin E1 derivative, in the presence of α - and β -cyclodextrins in the solid state. *International Journal of Pharmaceutics.* **509**, 338-347 (2016).
- 50) Hunt MA, Rusa CC, Tonelli AE, Balik CM. Structure and stability of columnar cyclomaltohexaose (α -cyclodextrin) hydrate. *Carbohydrate Research.* **339**(17), 2805-2810 (2004).
- 51) Karoyo A.H, Sidhu P, Wilson L.D, Hazendonk P. Characterization and dynamic properties for the solid inclusion complexes of β -cyclodextrin and perfluorooctanoic acid. *The Journal of Physical Chemistry B.* **117**(27), 8269-8282 (2013).
- 52) Ikuta N, Endo T, Hosomi S, et al. Structural Analysis of Crystalline R(+)- α -Lipoic Acid- α -cyclodextrin Complex Based on Microscopic and Spectroscopic Studies. *Int J Mol Sci.* **16**(10), 24614-24628 (2015).
- 53) Xiao C.F, Li K, Huang R, He G.J, Zhang J.Q, Zhu L, Yang Q.Y, Jiang K.M, Jin Y,

- Lin J. Investigation of inclusion complex of epothilone A with cyclodextrins. *Carbohydr Polym.* **102**, 297-305 (2014).
- 54) Cabral Marques H.M, Hadgraft j, Kellaway I.W. Studies of cyclodextrin inclusion complexes. I. The salbutamol-cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC. *Int J Pharm.* **63**, 259-266 (1990).
- 55) Chadha R, Arora P, Bhandari S, Jain DSee fewer. Effect of hydrophilic polymer on complexing efficiency of cyclodextrins towards efavirenz-characterization and thermodynamic parameters. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* **72**(3-4), 275-287 (2012).
- 56) Li S, Lin X, Xu K, He J, Yang H, Li H. Co-grinding Effect on Crystalline Zaltoprofen with β -cyclodextrin/Cucurbit[7]uril in Tablet Formulation. *Sci Rep.* 7:45984 (2017).
- 57) Giordano F, Novak C, Moyano J.R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochimica Acta.* **380**, 123-151 (2001).
- 58) Barbosa JA, Zoppi A, Quevedo MA, et al. Triethanolamine stabilization of methotrexate- β -cyclodextrin interactions in ternary complexes. *Int J Mol Sci.* **15**(9), 17077-17099 (2014).
- 59) Hădărugă DI, Birău Mitroi CL, Gruia AT, Păunescu V, Bandur GN, Hădărugă NG. Moisture evaluation of β -cyclodextrin/fish oils complexes by thermal analyses: A data review on common barbel (*Barbus barbus* L.), Pontic shad (*Alosa immaculata* Bennett), European wels catfish (*Silurus glanis* L.), and common bleak (*Alburnus alburnus* L.) living in Danube river. *Food Chem.* **236**, 49-58 (2017).
- 60) Zhao R, Tan T, Sandström C. NMR studies on puerarin and its interaction with beta-cyclodextrin. *J Biol Phys.* **37**(4), 387-400 (2011).

- 61) Ogawa N, Hashimoto T, Furuishi T, Nagase H, Endo T, Yamamoto H, Kawashima Y, Ueda H. Solid-state characterization of sertraline base- β -cyclodextrin inclusion complex. *J Pharm Biomed Anal.* **107**, 265-272 (2015).
- 62) Breheret E.F, Martin M.M. Electronic relaxation of troponoids: tropolone fluorescence. *Journal of Luminescence.* **17**, 49-60 (1978).
- 63) MacKenzie V.J, Sinha H.K, Wallace S.C, Steera R.P. Photophysics of tropolone. *Chemical Physics Letters.* **305**, 1-7 (1999).
- 64) Inoue Y, Hasegawa N, Tozuka Y, Yonemochi E, Oguchi T, Higashi K, Moribe K, Yamamoto K. Molecular states of p-dimethylaminobenzonitrile coground with β -cyclodextrin investigated using solid-state fluorescence spectroscopy. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* **59**(10), 1299-1302 (2011).
- 65) Ikuta N, Tanaka A, Otsubo A, et al. Spectroscopic studies of R(+)- α -lipoic acid--cyclodextrin complexes. *Int J Mol Sci.* **15**(11), 20469-20485 (2014).
- 66) Muankaew C, Jansook P, Stefánsson E, Loftsson T. Effect of γ -cyclodextrin on solubilization and complexation of irbesartan: influence of pH and excipients. *Int J Pharm.* **474**(1-2), 80-90 (2014).
- 67) Mohamad S, Surikumaran H, Rao M, Marimuthu T, Chandrasekaram K, Subramaniam P. Conventional study on novel dicationic ionic liquid inclusion with β -cyclodextrin. *Int J Mol Sci.* **12**, 6329-6345 (2011).
- 68) Nguyen T.A, Liu B, Zhao J, Thomas D.S, Hook J.M. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chem.* **136**, 186-192 (2013).

- 69) Reddy MN, Rehana T, Ramakrishna S, Chowdhary KP, Diwan PV. Beta-cyclodextrin complexes of celecoxib: molecular-modeling, characterization, and dissolution studies. *AAPS PharmSci.* **6**(1), 68-76 (2004).
- 70) Cugovčan M, Jablan J, Lovrić J, Cinčić D, Galić N, Jug M. Biopharmaceutical characterization of praziquantel cocrystals and cyclodextrin complexes prepared by grinding. *J Pharm Biomed Anal.* **137**, 42-53 (2017).
- 71) Zhou Q, Wei X, Dou W, Chou G, Wang Z. Preparation and characterization of inclusion complexes formed between baicalein and cyclodextrins. *Carbohydrate Polymers.* **95**(2), 733-739 (2013).
- 72) Ritter H, Cheng J, Tabatabai M. Influence of cyclodextrin on the solubility of a classically prepared 2-vinylcyclopropane macromonomer in aqueous solution. *Beilstein J Org Chem.* **8**, 1528-1535 (2012).
- 73) Schneider H, Hacket F, Rüdiger V, Ikeda H. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chem Rev.* **98**, 1755-1785 (1998).
- 74) Kahle C, Deubner R, Schollmayer C, Scheiber J, Baumann K, Holzgrabe U. NMR spectroscopic and molecular modelling studies on cyclodextrin-dipeptide inclusion complexes. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 1578-1589 (2005).
- 75) Dufour G, Evrard B, de Tullio P. 2D-Cosy NMR Spectroscopy as a Quantitative Tool in Biological Matrix: Application to Cyclodextrins. *AAPS J.* **17**(6), 1501-1510 (2015).
- 76) Saha S, Roy A, Roy K, Roy MN. Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of β -cyclodextrin with vitamin molecules. *Sci Rep.* **6**, 35764 (2016).

- 77) García A, Leonardi D, Salazar MO, Lamas MC. Modified β -cyclodextrin inclusion complex to improve the physicochemical properties of albendazole. complete in vitro evaluation and characterization. *PLoS One*. **9**(2), e88234 (2014).
- 78) Aiello F, Uccello-Barretta G, Falugiani N, Nardelli F, Balzano F. Cyclodextrins as inhibitors of the precipitation of riboflavin-5'-phosphate due to presence of zinc chloride: A NMR investigation. *J Pharm Biomed Anal*. **144**, 183-187 (2017).
- 79) Gannimani R, Ramesh M, Mtambo S, Pillay K, Soliman ME, Govender P. γ -Cyclodextrin capped silver nanoparticles for molecular recognition and enhancement of antibacterial activity of chloramphenicol. *J Inorg Biochem*. **157**, 15-24 (2016).
- 80) Lis-Cieplak A, Sitkowski J, Kolodziejki W. Comparative proton nuclear magnetic resonance studies of amantadine complexes formed in aqueous solutions with three major cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **103**, 274-282 (2014).
- 81) Miletic T, Kyriakos K, Graovac A, Ibric S. Spray-dried voriconazole-cyclodextrin complexes: solubility, dissolution rate and chemical stability. *Carbohydrate Polymers*. **98**, 122-131 (2013).
- 82) Zoppi A, Delrivo A, Aiassa V, Longhi MR. Binding of sulfamethazine to β -cyclodextrin and methyl- β -cyclodextrin. *AAPS PharmSciTech*. **14**(2), 727-375 (2013).
- 83) Ben Mihoub A, Larue L, Moussaron A, et al. Use of Cyclodextrins in Anticancer Photodynamic Therapy Treatment. *Molecules*. **23**(8), 1936 (2018).

- 84) Zhang J, Ma PX. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective. *Adv Drug Deliv Rev.* **65**(9), 1215-1233 (2013).
- 85) Braga MA, Martini MF, Pickholz M, Yokaichiya F, Franco MK, Cabeça LF, Guilherme VA, Silva CM, Limia CE, de Paula E. Clonidine complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: From physico-chemical characterization to in vivo adjuvant effect in local anesthesia. *J Pharm Biomed Anal.* **119**, 27-36 (2016).
- 86) Mennini N, Bragagni M, Maestrelli F, Mura P. Physico-chemical characterization in solution and in the solid state of clonazepam complexes with native and chemically-modified cyclodextrins. *J Pharm Biomed Anal.* **89**, 142-149 (2014).
- 87) Rassa G, Soddu E, Cossu M, et al. Solid microparticles based on chitosan or methyl- β -cyclodextrin: a first formulative approach to increase the nose-to-brain transport of deferoxamine mesylate. *J Control Release.* **201**, 68-77 (2015).
- 88) Desai KG, Olsen KF, Mallery SR, Stoner GD, Schwendeman SP. Formulation and in vitro-in vivo evaluation of black raspberry extract-loaded PLGA/PLA injectable millicylindrical implants for sustained delivery of chemopreventive anthocyanins. *Pharm Res.* **27**(4), 628-643 (2010).
- 89) Sun X, Yu Z, Cai Z, Yu L, Lv Y. Voriconazole Compositated Polyvinyl Alcohol/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Nanofibers for Ophthalmic Delivery. *PLoS One.* **11**(12), e0167961 (2016).
- 90) Ribeiro A, Figueiras A, Santos D, Veiga F. Preparation and solid-state characterization of inclusion complexes formed between miconazole and methyl-beta-cyclodextrin. *AAPS PharmSciTech.* **9**(4), 1102-1109 (2008).

- 91) Ammar HO, Makram TS, Mosallam S. Effect of Polymers on the Physicochemical Properties and Biological Performance of Fenoprofen Calcium Dihydrate-Triacetyl- β -Cyclodextrin Complex. *Pharmaceutics*. **9**(3), 23 (2017).
- 92) Aytac Z, Celebioglu A, Yildiz ZI, Uyar T. Efficient Encapsulation of Citral in Fast-Dissolving Polymer-Free Electrospun Nanofibers of Cyclodextrin Inclusion Complexes: High Thermal Stability, Longer Shelf-Life, and Enhanced Water Solubility of Citral. *Nanomaterials (Basel)*. **8**(10), 793 (2018).
- 93) Fan H, Wang J, Meng Q, Xu X, Fan T, Jin Z. Preparation of Photoirradiation Molecular Imprinting Polymer for Selective Separation of Branched Cyclodextrins. *Molecules*. **22**(2), 288 (2017).
- 94) Cui L, Zhang Z, Sun E, Jia X, Qian Q. Effect of β -cyclodextrin complexation on solubility and enzymatic hydrolysis rate of icariin. *J Nat Sci Biol Med*. **4**(1), 201-206 (2013).
- 95) Manca ML, Zaru M, Ennas G, et al. Diclofenac-beta-cyclodextrin binary systems: physicochemical characterization and in vitro dissolution and diffusion studies. *AAPS PharmSciTech*. **6**(3), 464-472 (2005).
- 96) Santos PS, Souza LKM, Araújo TSL, et al. Methyl- β -cyclodextrin Inclusion Complex with β -Caryophyllene: Preparation, Characterization, and Improvement of Pharmacological Activities. *ACS Omega*. **2**(12), 9080-9094 (2017).
- 97) Grillo R, de Melo NF, Moraes CM, de Lima R, Menezes CM, Ferreira EI, Rosa AH, Fraceto LF. Study of the interaction between hydroxymethylnitrofurazone and 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *J Pharm Biomed Anal*. **47**(2), 295-302 (2008).

- 98) Figueiras A, Sarraguça JM, Pais AA, Carvalho RA, Veiga JF. The role of L-arginine in inclusion complexes of omeprazole with cyclodextrins. *AAPS PharmSciTech.* **11**(1), 233-240 (2010).
- 99) Jansook P, Pichayakorn W, Muankaew C, Loftsson T. Cyclodextrin-poloxamer aggregates as nanocarriers in eye drop formulations: dexamethasone and amphotericin B. *Drug Dev Ind Pharm.* **42**(9), 1446-1454 (2016).
- 100) Campos EVR, Proença PLF, Oliveira JL, et al. Chitosan nanoparticles functionalized with β -cyclodextrin: a promising carrier for botanical pesticides. *Sci Rep.* **8**(1), 2067 (2018).
- 101) García A, Leonardi D, Vasconi MD, Hinrichsen LI, Lamas MC. Characterization of albendazole-randomly methylated- β -cyclodextrin inclusion complex and in vivo evaluation of its antihelmitic activity in a murine model of Trichinellosis. *PLoS One.* **9**(11), e113296 (2014).
- 102) Ali SM, Fatma K, Dhokale S. Structure elucidation of β -cyclodextrin-xylazine complex by a combination of quantitative (1)H-(1)H ROESY and molecular dynamics studies. *Beilstein J Org Chem.* **9**, 1917-1924 (2013).
- 103) Grosch AA, van der Lubbe SCC, Fonseca Guerra C. Nature of Intramolecular Resonance Assisted Hydrogen Bonding in Malonaldehyde and Its Saturated Analogue. *J Phys Chem A.* **122**(6), 1813-1820 (2018).
- 104) Dick BL, Patel A, McCammon JA, Cohen SM. Effect of donor atom identity on metal-binding pharmacophore coordination. *J Biol Inorg Chem.* **22**(4), 605-613 (2017).
- 105) Higashi K, Ideura S, Waraya H, Moribe K, Yamamoto K. Structural evaluation of crystalline ternary γ -cyclodextrin complex. *J Pharm Sci.* **100**, 325-333 (2011).

- 106) Inoue Y, Watanabe S, Suzuki R, Murata I, Kanamoto I. Evaluation of actarit/ γ -cyclodextrin complex prepared by different methods. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* **81**, 161-168 (2015).
- 107) Prabu S, Sivakumar K, Swaminathan M, Rajamohan R. Preparation and characterization of host-guest system between inosine and β -cyclodextrin through inclusion mode. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **147**, 151-157 (2015).
- 108) Toropainen T, Heikkilä T, Leppänen J, Matilainen L, Velaga S, Jarho P, Carlfors J, Lehto VP, Järvinen T, Järvinen K. Crystal structure changes of gamma-cyclodextrin after the SEDS process in supercritical carbon dioxide affect the dissolution rate of complexed budesonide. *Pharm Res.* **24**(6), 1058-1066 (2007).
- 109) Rodrigues LB, Martins AOBPB, Ribeiro-Filho J, Cesário FRAS, E Castro FF, de Albuquerque TR, Fernandes MNM, da Silva BAF, Quintans Júnior LJ, Araújo AAS, Menezes PDP, Nunes PS, Matos IG, Coutinho HDM, Goncalves Wanderley A, de Menezes IRA. Anti-inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with β -cyclodextrin (β -CD) in mice. *Food Chem Toxicol.* **109**(Pt 2), 836-846 (2017).
- 110) Zhao R, Tan T, Sandström C. NMR studies on puerarin and its interaction with beta-cyclodextrin. *J Biol Phys.* **37**(4), 387-400 (2011).
- 111) Mitsuzuka A, Fujii A, Ebata T, Mikamia N. Infrared spectroscopy of OH stretching vibrations of hydrogen-bonded tropolone-(H₂O)_n (n=1-3) and tropolone-(CH₃OH)_n (n=1 and 2) clusters. *Journal of chemical physics.* **105**(7), 2618-2627 (1996).
- 112) Higashi K, Tozuka Y, Moribe K, Yamamoto K. Salicylic acid/ γ -cyclodextrin 2:1 and 4:1 complex formation by sealed-heating method. *J Pharm*

- Sci.* **99**, 4192-4200 (2010).
- 113) Zhao R, Tan T, Sandström C. NMR studies on puerarin and its interaction with beta-cyclodextrin. *J Biol Phys.* **37**(4), 387-400 (2011).
- 114) Shih YH, Lin DJ, Chang KW, et al. Evaluation physical characteristics and comparison antimicrobial and anti-inflammation potentials of dental root canal sealers containing hinokitiol in vitro. *PLoS One.* **9**(6), e94941 (2014).
- 115) Jeong D, Joo SW, Shinde VV, Cho E, Jung S. Carbohydrate-Based Host-Guest Complexation of Hydrophobic Antibiotics for the Enhancement of Antibacterial Activity. *Molecules.* **22**(8), 1311 (2017).
- 116) Mohamed Elagawanyab, Lamees Hegazy, Feng Caoc, Maureen J. Donlind, Nigam Rathe, John Tavisf and Bahaa Elgendy. Identification of 4-isopropyl-thiotropolone as a novel anti-microbial: regioselective synthesis, NMR characterization, and biological evaluation. *RSC Adv.* **8**, 29967-29975 (2018).
- 117) Owen L, Laird K, Wilson PB. Structure-activity modelling of essential oils, their components, and key molecular parameters and descriptors. *Mol Cell Probes.* **38**, 25-30 (2018).
- 118) Aleem O, Kuchekar B, Pore Y, Late S. Effect of beta-cyclodextrin and hydroxypropyl beta-cyclodextrin complexation on physicochemical properties and antimicrobial activity of cefdinir. *J Pharm Biomed Anal.* **47**(3), 535-540 (2008).
- 119) Zhao M, Zhu D, Sun-Waterhouse D, Su G, Lin L, Wang X, Dong Y. Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. *Food. Chem.* **120**, 1138-1142 (2010).
- 120) Emerson H. Santos, Juliane A. Kamimura, Laura E. Hill, Carmen L. Gomes LWT. A Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as

- delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. *Food Science and Technology*. **60**, 583-592 (2015).
- 121) Morita Y, Sakagami Y, Okabe T, Ohe T, Inamori Y, Ishida N. The mechanism of the bactericidal activity of hinokitiol. *Biocontrol. Sci.* **12**, 101-110 (2007).
- 122) Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC, et al. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Molecules*. **22**(1), 70 (2017).
- 123) Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH, Bradford PA. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. *J Antimicrob Chemother.* **57**(3), 573-576 (2006).
- 124) Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**(5), 1207-1212 (1998).
- 125) Wolfe EF, Klepser ME, Pfaller MA. Antifungal dynamics of amphotericin B and fluconazole in combination against *Candida albicans*, effect of exposure time. *Pharmacotherapy*. **17**, 189-189 (1997).
- 126) White RL, Bugess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: Time-kill, checkerboard and E test. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1914-1918 (1996).
- 127) Stone LK, Baym M, Lieberman TD, Chait R, Clardy J, Kishony R. Compounds that select against the tetracycline-resistance efflux pump. *Nat Chem Biol.* **12**(11), 902-904 (2016).
- 128) Jug M, Kosalec I, Maestrelli F, Mura P. Analysis of triclosan inclusion

- complexes with β -cyclodextrin and its water-soluble polymeric derivative. *J Pharm Biomed Anal.* **54**(5), 1030-1039 (2011).
- 129) Kogawa AC, Zoppi A, Quevedo MA, Nunes Salgado HR, Longhi MR. Increasing doxycycline hyclate photostability by complexation with β -cyclodextrin. *AAPS PharmSciTech.* **15**(5), 1209-1217 (2014).
- 130) Romeo L, Lanza Cariccio V, Iori R, Rollin P, Bramanti P, Mazzon E. The α -Cyclodextrin/Moringin Complex: A New Promising Antimicrobial Agent against *Staphylococcus aureus*. *Molecules.* **23**(9), 2097 (2018).
- 131) Jepras RI, Paul FE, Pearson SC, Wilkinson MJ. Rapid assessment of antibiotic effects on *Escherichia coli* by bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol and flow cytometry. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**(9), 2001-2005 (1997).
- 132) Wickens HJ, Pinney RJ, Mason DJ, Gant VA. Flow cytometric investigation of filamentation, membrane patency, and membrane potential in *Escherichia coli* following ciprofloxacin exposure. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**(3), 682-687 (2000).
- 133) Abraham P, Sundaram A, R A, V R, George S, Kumar KS. Structure-Activity Relationship and Mode of Action of a Frog Secreted Antibacterial Peptide B1CTcu5 Using Synthetically and Modularly Modified or Deleted (SMMD) Peptides. *PLoS One.* **10**(5), e0124210 (2015).
- 134) Arnusch CJ, Ulm H, Josten M, et al. Ultrashort peptide bioconjugates are exclusively antifungal agents and synergize with cyclodextrin and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* **56**(1), 1-9 (2012).
- 135) Gnanadhas DP, Ben Thomas M, Thomas R, Raichur AM, Chakravorty D. Interaction of silver nanoparticles with serum proteins affects their antimicrobial

- activity in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* **57**(10), 4945-4955 (2013).
- 136) Rassam P, Copeland NA, Birkholz O, et al. Supramolecular assemblies underpin turnover of outer membrane proteins in bacteria. *Nature.* **523**(7560), 333-336 (2015).
- 137) Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, et al. Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol.* **9**, 197 (2009).
- 138) Morais DS, Guedes RM, Lopes MA. Antimicrobial Approaches for Textiles: From Research to Market. *Materials (Basel).* **9**(6), 498 (2016).
- 139) Astarie-Dequeker C, Le Guyader L, Malaga W, et al. Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. *PLoS Pathog.* **5**(2), e1000289 (2009).
- 140) Komaki N, Watanabe T, Ogasawara A, Sato N, Mikami T, Matsumoto T. Antifungal mechanism of hinokitiol against *Candida albicans*. *Biol Pharm Bull.* **31**(4), 735-737 (2008).
- 141) Kim DJ, Lee MW, Choi JS, Lee SG, Park JY, Kim SW. Inhibitory activity of hinokitiol against biofilm formation in fluconazole-resistant *Candida* species. *PLoS One.* **12**(2), e0171244 (2017).
- 142) Tang P, Ma X, Wu D, Li S, Xu K, Tang B, Li H. Posaconazole/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Improving dissolution while maintaining antifungal activity. *Carbohydr Polym.* **142**, 16-23 (2016).
- 143) Teodoro GR, Gontijo AVL, Borges AC, et al. Gallic acid/hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex: Improving solubility for application on in vitro/ in vivo *Candida albicans* biofilms. *PLoS One.* **12**(7), e0181199 (2017).

- 144) Ma B, Ban X, Huang B, et al. Interference and Mechanism of Dill Seed Essential Oil and Contribution of Carvone and Limonene in Preventing Sclerotinia Rot of Rapeseed. *PLoS One*. **10**(7), e0131733 (2015).
- 145) Singh M, Kasat VO. Efficacy of various combinations of irrigants and medicaments on *Candida albicans*: An in vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent*. **5**(3), 157-162 (2015).
- 146) Cairns TC, Nai C, Meyer V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biol Biotechnol*. **5**, 13 (2018).
- 147) Hang YD, Splittstoesser DF, Woodams EE. Utilization of brewery spent grain liquor by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol*. **30**(5), 879-880 (1975).
- 148) Shishido TK, Jokela J, Kolehmainen CT, et al. Antifungal activity improved by coproduction of cyclodextrins and anabaenolysins in Cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **112**(44), 13669-13674 (2015).
- 149) Mohammed NN, Pandey P, Khan NS, et al. Clotrimazole-cyclodextrin based approach for the management and treatment of Candidiasis - A formulation and chemistry-based evaluation. *Pharm Dev Technol*. **21**(5), 619-629 (2015).
- 150) Lestner JM, Smith PB, Cohen-Wolkowicz M, Benjamin DK, Hope WW. Antifungal agents and therapy for infants and children with invasive fungal infections: a pharmacological perspective. *Br J Clin Pharmacol*. **75**(6), 1381-1395 (2012).
- 151) Spampinato C, Leonardi D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Int*. **2013**, 204237 (2013).
- 152) Lee M, Hwang JH, Lim KM. Alternatives to In Vivo Draize Rabbit Eye and Skin

- Irritation Tests with a Focus on 3D Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium and Epidermis Models. *Toxicol Res.* **33**(3), 191-203 (2017).
- 153) K.C.Symes. The relationship between the covalent structure of the Xanthomonas polysaccharide (Xanthan) and its function as a thickening, suspending and gelling agent. *Food Chemistry.* **6**, 63-76 (1980).
- 154) Inoue Y, Iwazaki Y, Onuki Y, Funatani C, Murata I, Kanamoto I. Examination of gelling agents to produce acetaminophen jelly. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* **63**(7), 519-524 (2015).
- 155) Kumar A, Rao KM, Han SS. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. *Carbohydr Polym.* **180**, 128-144 (2018).
- 156) Li L, Ni R, Shao Y, Mao S. Carrageenan and its applications in drug delivery. *Carbohydr Polym.* **15**, 103:1-11 (2014).
- 157) Prajapati VD, Maheriya PM, Jani GK, Solanki HK, Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate Polymers.* **105**, 97-112 (2014).
- 158) Luvielmo Mde M, Borges CD, Toyama Dde O, Vendruscolo CT, Scamparini AR. Structure of xanthan gum and cell ultrastructure at different times of alkali stress. *Braz J Microbiol.* **47**(1), 102-109 (2016).
- 159) Viseras C, Aguzzi C, Cerezo P, Galindo AL. Uses of clay minerals in semisolid health care and therapeutic products. *Applied Clay Science.* **36**, 37-50 (2007).
- 160) Abu-Jdayil B, Mohameed HA, Sa'id M, Snobar T. Rheological characterization of hair shampoo in the presence of dead sea salt. *International Journal of Cosmetic Science.* **26**, 19-29 (2004).
- 161) Al-Achi A Phd, Baghat T Bs, Chukwubeze O Bs, Dembla I Bs. Rheologic Profile,

- Specific Gravity, Surface Tension, and pH of Fifteen Over-the-Counter Preparations. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. **3**, 252-258 (2007).
- 162) Golkaram M, Fodor C, van Ruymbeke E, Loos K. Linear Viscoelasticity of Weakly Hydrogen-Bonded Polymers near and below the Sol-Gel Transition. *Macromolecules*. **51**(13), 4910-4916 (2018).
- 163) Viseras C, Aguzzi C, Cerezo P, Galindo AL, Uses of clay minerals in semisolid health care and therapeutic products. *Applied Clay Science*. **36**, 37-50 (2007).
- 164) Ali SM, Yosipovitch G. Skin pH: from basic science to basic skin care. *Acta Dermato-Venereologica*. **93**, 261-267 (2013).
- 165) Yuguchi Y, Thuy TT, Urakawa H, Kajiwarra K. Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentration dependence. *Food Hydrocolloids*. **16**, 515-522 (2002).
- 166) Tapiaa C, Escobara Z, Costab E, Hagara JS, Valenzuelaa F, Basualtoa C, Gaib MN, Pedramc MY. Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixtures of chitosan–alginate and chitosan–carrageenan as prolonged diltiazem clorhydrate release system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **57**, 65-75 (2004).
- 167) García-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gómez E, Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, **18**, 549-579 (2000).
- 168) Cunha L, Grenha A. Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications. *Mar Drugs*. **14**(3), 42 (2016).
- 169) Song KW, Kim YS, Chang GS. Rheology of Concentrated Xanthan Gum Solutions: Steady Shear Flow Behavior. *Fibers and Polymers*. **7**, 129-138 (2006).

- 170) Neto P, Ferreira M, Bahia F, Costa P. Improvement of the methods for skin mechanical properties evaluation through correlation between different techniques and factor analysis. *Skin Research and Technology*. **19**(4), 1-12 (2013).
- 171) Job P. Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Ann Chim Phys*. **9**, 113-203 (1928).
- 172) CLSI Document M7-A7, Approved Standard-Ninth Edition (2006).
- 173) Takeda Y. Isshiki Y. Sakuda K. Sakuma K. Kondo S. Improved Methods for Estimation of Antimicrobial Activities of Volatile and Hydrophobic Fragrance Ingredients *J Jpn Cosmet Sci Soc*. **32**, 10-17 (2008).